

RENATA CRISTIANE DOS REIS

**PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES NK1 NAS RESPOSTAS  
INFLAMATÓRIA E FEBRIL  
INDUZIDAS POR ENDOTOXINA BACTERIANA**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre em  
Farmacologia, Departamento de Farmacologia,  
Setor de Ciências Biológicas, da Universidade  
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Aleksander R. Zampronio

Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela A. Cabrini

CURITIBA  
2010

*Dedico este trabalho à minha Mãe, Ana Dias, e às minhas irmãs Meire e Rozeli, por todo amor, apoio, e incentivo dados, fundamentais na realização deste trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio, pela orientação e amizade durante esses dez anos de convivência; por ter sempre compartilhado seus imensuráveis conhecimentos científicos, contribuindo assim de forma relevante tanto para o meu crescimento profissional quanto pessoal; e por sempre exigir o melhor.

À minha Co-Orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela de Almeida Cabrini, pela colaboração, apoio e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os Professores do Departamento de Farmacologia pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e do Biotério, em especial à Sílvia, à Nair e ao Luiz, pela amizade, colaboração e apoio técnico.

A todos os amigos de laboratório, em especial à Haissa por toda amizade e colaboração nos últimos tempos.

Às amigas irmãs Shirley e Marcia pela amizade, companheirismo e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos amigos do coração Cleni, Cláudia, Márcio, Lucinéia, Cassieli e Silmara, pela amizade, incentivo, confiança e apoio em todos os momentos.

Aos funcionários da Unidade de Farmácia Hospitalar do HC-UFPR, em especial aos das equipes de Nutrição Parenteral e de Dispensação, por terem possibilitado a conciliação de horários, facilitando assim o desenvolvimento deste trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

E, com respeito, aos animais, “meus meninos”, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

"Não há mestre que não possa ser aluno."

**Baltasar Gracián y Morales**

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele,  
mas aquilo em que ele nos transforma”

**John Ruskin**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1. LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS).....	15
1.2. MIGRAÇÃO CELULAR .....	16
1.3. RESPOSTA FEBRIL E REAÇÃO DE FASE AGUDA.....	21
1.4. RESPOSTA FEBRIL E NERVO VAGO.....	24
1.5. SUBSTÂNCIA P .....	27
1.6. JUSTIFICATIVA.....	31
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>32</b>
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
3.1. ANIMAIS .....	35
3.2. ESTERILIZAÇÃO .....	35
3.3. DROGAS E SOLUÇÕES.....	35
3.4. AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS NA CAVIDADE PERITONIAL	36
3.5. AVALIAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO.....	37
3.6. IMPLANTE DO REGISTRADOR REMOTO DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONIAL .....	37
3.7. IMPLANTE DA CÂNULA NO VENTRÍCULO LATERAL .....	38
3.8. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	39
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
4.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DO SR140333 NA FEBRE INDUZIDA POR LPS.....	42
4.2. EFEITO DO SR140333 SOBRE O EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO POR SUBSTÂNCIA P OU LPS .....	47
4.3. MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR SUBSTÂNCIA P .....	50

4.4. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CONCOMITANTE DE LPS E SUBSTÂNCIA P NA MIGRAÇÃO CELULAR .....	52
4.5. EFEITO DO SR140333 SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS RESIDENTES NA CAVIDADE PERITONIAL .....	54
4.6. MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR LPS .....	56
4.7. EFEITO DO SR140333 NA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR LPS .....	58
4.8. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DO SR140333 NA FEBRE INDUZIDA POR LPS .....	60
4.9. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DO SR140333 NO AUMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL INDUZIDO POR SUBSTÂNCIA P.....	65
4.10 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DO SR140333 NA FEBRE INDUZIDA POR IL-1 $\beta$ .....	67
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1A:	Efeito da administração sistêmica do SR140333 (0,3 mg/kg) na febre induzida por LPS em ratos.....	43
Figura 1B:	Efeito da administração sistêmica do SR140333 (1,0 mg/kg) na febre induzida por LPS em ratos.....	44
Figura 1C:	Efeito da administração sistêmica do SR140333 (3,0 mg/kg) na febre induzida por LPS em ratos.....	45
Figura 1D:	Efeito da administração sistêmica do SR140333 na temperatura corporal basal de ratos	46
Figura 2A:	Efeito do SR140333 no extravasamento plasmático induzido por substância P em ratos.....	48
Figura 2B:	Efeito do SR140333 no extravasamento plasmático induzido por LPS em ratos.....	49
Figura 3:	Migração de neutrófilos induzida por Substância P em ratos	51
Figura 4:	Efeito da administração concomitante de LPS e Substância P na migração de neutrófilos em ratos.....	53
Figura 5:	Efeito do SR140333 sobre o número de células residentes na cavidade peritoneal de ratos.....	55
Figura 6:	Migração de neutrófilos induzida por LPS em ratos.....	57
Figura 7:	Efeito do SR140333 na migração de neutrófilos induzida por LPS em ratos.....	59
Figura 8A:	Efeito da administração central do SR140333 (0,3 µg/sítio) na febre induzida por LPS em ratos.....	61
Figura 8B:	Efeito da administração central do SR140333 (1,0 µg/sítio) na febre induzida por LPS em ratos.....	62
Figura 8C:	Efeito da administração central do SR140333 (3,0 µg/sítio) na febre induzida por LPS em ratos.....	63
Figura 8D:	Efeito do SR140333 na temperatura corporal basal de ratos	64
Figura 9:	Efeito da administração central do SR140333 no aumento da temperatura corporal induzido por substância P em ratos	66
Figura 10:	Efeito da administração central do SR140333 na febre induzida por IL-1β em ratos.....	68



## LISTA DE ABREVIATURAS

AE – azul de Evans  
AMPc – adenosina 3,5-monofosfato cíclico  
APO/HA – área pré-óptica do hipotálamo anterior  
CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina  
COX – ciclooxigenase  
CRF – fator liberador de corticotrofina  
ELAM – molécula de adesão, E-selectina  
EPM – erro padrão da média  
ET – endotelina  
fMLP – formil-metionil-leucil-fenilalanina  
h – horas  
ICAM – molécula de adesão intercelular  
icv – intracerebroventricular  
id – intra-dérmica  
IL- interleucina  
ip - intraperitoneal  
LAM – molécula de adesão, L-selectina  
LBP – proteína ligante de LPS  
LPS – lipopolissacarídeo de *E. coli*  
LTB<sub>4</sub> – leucotrieno B<sub>4</sub>  
MIP – proteína inflamatória derivada de macrófagos  
NFκB – fator de transcrição nuclear-κB  
NK1 – receptor para neurocininas tipo 1  
OVLT – *organum vasculosum da laminae terminalis*  
PAF – fator de ativação plaquetária  
PAMPs – “padrões-moleculares associados a patógenos”  
PE – pirogênios endógenos  
PFPF – fator pirogênico pré-formado derivado de macrófagos  
PG – prostaglandina  
PMN – polimorfonucleares  
PPTA – gene codificador de pré-pró-taquicinina A  
PVN – veneno de *P. nigriventer*

RFA – reação/resposta de fase aguda

rm – recombinante murino

RNA<sub>m</sub> – ácido ribonucleico mensageiro

rr – recombinante de rato

sc - subcutânea

SNC – sistema nervoso central

SP – substância P

SR140333 – (cloreto de (S)-1-[2-[3-(3,4-diclorofenil)-1 (3-isopropoxi-feniacetil) piperidin-3il] etil]-4-fenil-1 azaniabicyclo[2.2.2] octano)

TLR – receptores *toll-like*

TNF – fator de necrose tumoral

VCAM – molécula de adesão da célula vascular

## RESUMO

As respostas inflamatória e febril são importantes para a defesa do organismo contra agentes agressores. Mediadores inflamatórios liberados por células do sistema imune e neurotransmissores e peptídeos provenientes de fibras nervosas, especialmente das fibras vagais, são importantes na interligação destas respostas. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório evidenciaram a importância do nervo vago e da acetilcolina, o principal neurotransmissor das fibras eferentes vagais, na manutenção das células residentes na cavidade peritoneal e, então, na modulação das respostas inflamatória e febril. A substância P (SP) é um neuropeptídeo abundante nas fibras aferentes vagais e dados da literatura sugerem que a mesma é capaz de modular a liberação de citocinas, bem como a liberação de outros mediadores inflamatórios pelas células do sistema imune, ao se ligar aos receptores para taquicinas NK1. No entanto, faltam estudos *in vivo* que relacionem as consequências desses efeitos mediados pela substância P nas respostas inflamatória e febril. Neste trabalho avaliou-se o papel deste neuropeptídeo nestas respostas, testando-se o efeito do antagonista seletivo de receptor NK1, SR140333, nas respostas inflamatórias (extravasamento plasmático e migração celular) e febril, induzidas por lipopolissacarídeo (LPS). Os resultados mostraram que a administração sistêmica de SR140333 não é capaz de modificar o número de células residentes na cavidade peritoneal; a febre, o extravasamento plasmático ou a migração celular induzidos por LPS, sugerindo que a SP liberada periféricamente não é essencial para o desencadeamento dessas respostas induzidas por esta endotoxina. No entanto, a administração central de SR140333 reduziu significativamente a febre induzida pela administração periférica de LPS. Esses dados evidenciam um papel relevante da SP presente no sistema nervoso central na resposta febril desencadeada pelo LPS. Em adição, a administração intracerebroventricular de substância P, em animais tratados com captopril, induziu uma resposta febril que foi significativamente reduzida pelo SR140333. Considerando que muitos mediadores estão envolvidos na resposta febril induzida por LPS, como a interleucina (IL)-1 $\beta$ , avaliou-se o efeito do SR140333 na febre induzida por esta citocina, que é considerada um dos principais pirogênicos endógenos. Porém, diferente do que foi observado para o LPS, o SR140333 não modificou a febre induzida pela IL-1 $\beta$ . Desta forma, é possível que a SP esteja sendo liberada antes da IL-1 $\beta$  na cascata de mediadores da febre do LPS ou, ainda, que a SP esteja atuando na via de outros mediadores envolvidos na resposta febril desta endotoxina.

## ABSTRACT

*The inflammatory and febrile responses are essential components of host defense against environmental aggressors such as pathogens. Inflammatory mediators released by the immune cells, along with peptides and neurotransmitters, mainly from the vagus nerve, play a key role in these neuro-immune interactions. Previous studies in our lab have shown an important role of the acetylcholine released from the efferent fibers of the vagus nerve on the maintenance of peritoneal resident cells and consequently in the modulation of inflammatory and febrile responses. Substance P (SP) is an abundant neuropeptide of the afferent vagus fibers, and data from literature suggest that SP is able to modulate apoptosis and inflammatory mediators release such as cytokines and others, through activation of tachykinins NK1 receptors. However, there is a lack of in vivo studies evaluating the role of SP in inflammatory and febrile responses. In this study we investigated the effect of the selective NK1 receptor antagonist, SR140333, on the inflammatory (protein extravasation and cell migration) and febrile responses induced by lipopolysaccharide (LPS). The results showed that the systemic injection of SR140333 did not modify the fever, protein extravasation, or the cell migration to the peritoneal cavity induced by LPS, suggesting that peripheral SP is not essential to the development of these responses. However, intracerebroventricular administration of SR140333 significantly reduced the fever induced by peripheral injection of LPS. These data emphasize an important role of the SP on the central nervous system during the febrile response induced by this endotoxin. In addition, intracerebroventricular injection of SP in captopril-treated rats induced a febrile response that was significantly reduced by SR140333. Considering that there are many mediators involved in the LPS-induced fever, such as interleukin (IL)-1 $\beta$ , we also evaluated the effect of SR140333 on the fever induced by this cytokine which is considered one of the most important endogenous pyrogens. Surprisingly, different from what we observed after LPS, SR140333 did not modify the fever induced by IL-1 $\beta$ . Therefore, it is possible that SP is released previously to IL-1 $\beta$ , or that SP acts on different pathways involved in LPS-induced fever. Altogether these data suggest that, different from what we have observed for acetylcholine, the substance P releasing peripherally is not relevant for fever, neutrophil migration or protein extravasation induced by LPS. However, central release of substance P is essential for LPS-induced fever, but not for IL-1 $\beta$ .*

# **1. INTRODUÇÃO**

O sistema imunológico tem papel fundamental na proteção do organismo contra agentes agressores. A resposta inflamatória é um dos mecanismos de defesa inespecíficos utilizados pelo sistema imune para re-estabelecer a homeostasia do organismo através da diluição, destruição ou isolamento dos agentes agressores (revisado por GALLIN et al., 1992; CRONSTEIN e WEISSMANN, 1993).

A inflamação é uma resposta do organismo à lesão ou destruição de um tecido, que envolve eventos vasculares e celulares, coordenados por múltiplos tipos de leucócitos, mediadores químicos e fatores de crescimento teciduais ou plasmáticos (WEAVER, 1995). Os principais mediadores envolvidos no processo inflamatório incluem a histamina, os eicosanóides, o fator de ativação plaquetária (PAF), os neuropeptídeos, o óxido nítrico, as citocinas, as cininas, o fragmento C5a do sistema complemento, dentre outros (para revisão ver BARNES et al., 1998).

Os mediadores liberados atuam localmente desencadeando os sinais característicos deste processo, ou seja, dor, calor, rubor e edema, acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado (ROCHA e SILVA, 1978; SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985). Microscopicamente esses sinais envolvem uma complexa série de eventos que incluem dilatação de arteríolas, capilares e vênulas, com aumento da permeabilidade e fluxo sanguíneo, exsudação de fluidos e migração de leucócitos para o foco inflamatório.

Os vários mediadores inflamatórios normalmente atuam restringindo as conseqüências e a extensão do dano tecidual, induzindo somente os sinais locais. Entretanto, dependendo da persistência ou intensidade da lesão, alguns mediadores podem difundir-se e mediar sinais e sintomas sistêmicos como febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda, leucocitose, ativação do sistema complemento, aumento da produção de glicocorticóides, alterações metabólicas e das concentrações plasmáticas de metais como ferro, cobre e zinco. Esta resposta sistêmica é denominada reação de fase aguda (RFA) (STADNYK e GAULDIE, 1991, ZEISBERGER, 1999).

A complexidade destas respostas tem até hoje exigido constante investigação e nosso grupo tem procurado entender os mecanismos envolvidos na interação da resposta inflamatória com a reação de fase aguda. Em continuidade a estes estudos, este trabalho teve como focos principais a migração de leucócitos, que faz parte da resposta inflamatória, e a resposta febril que faz parte da reação de

fase aguda. Tanto a resposta febril quanto a migração celular foram induzidas pela administração de Lipopolissacarídeo.

### 1.1. LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

O LPS é um componente estrutural da parede celular de bactérias Gram-negativas (RAETZ, 1990; RAETZ e WHITFIELD, 2002), grupo do qual fazem parte patógenos humanos como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, dentre outras; e é reconhecido como o principal fator responsável pelas manifestações tóxicas das infecções severas por bactérias Gram-negativas e da resposta inflamatória generalizada. Quando uma bactéria se multiplica, sofre lise ou morre, LPS é liberado da superfície celular (RIETSCHEL e BRADE, 1992; RIETSCHEL et al., 1994).

Os efeitos do LPS são mediados principalmente através dos receptores Toll-like (TLR)-4 (POLTORAK et al., 2000), mas outros mecanismos também podem estar envolvidos em suas ações (DOBROVOSKAIA e VOGEL, 2002). Os membros da família TLR são vistos como os receptores chave para o reconhecimento dos chamados “padrões-moleculares associados a patógenos - PAMPs”, necessários para a ativação do sistema de imunidade inata, que representa a primeira linha de defesa do organismo contra invasores/patógenos (ROTH et al., 2009). Pelo menos dez subtipos de TLR, reconhedores de vários produtos microbianos, foram identificados em humanos (MATSUSHIMA et al., 2007).

SHIMAZU et al. (1999) evidenciaram a presença de uma molécula não-membrânica que fisicamente se associa ao TLR4 e é essencial para uma ótima sinalização intracelular induzida pelo LPS, a proteína MD-2. Recentemente PARK et al. (2009) mostraram que o complexo estrutural envolvido no reconhecimento do LPS é formado por um dímero simétrico TLR4-MD-2-LPS. A transferência do LPS para TLR4-MD-2 envolve duas proteínas acessórias: a proteína ligante de LPS (LBP) e o CD14 (JIANG et al., 2000; MIYAKE, 2006). A LBP é uma proteína plasmática de fase aguda sintetizada no fígado, que catalisa a transferência do LPS de aglomerados de LPS para outras proteínas e/ou receptores (WAN et al., 1995; TOBIAS et al., 1997). O CD14 é uma molécula encontrada na superfície de células de origem mielóide como os monócitos, macrófagos e neutrófilos, podendo também ser visto em sua forma solúvel no plasma. Junto com a LBP, o CD14 pode mediar

diretamente várias ações do LPS em diferentes tipos celulares, ou indiretamente facilitando o desencadeamento de efeitos através dos TLR4 (HAZIOT et al., 1997; DOBROVOSKAIA e VOGEL, 2002).

Diversos tipos de células respondem à estimulação com LPS, como as células mononucleares e polimorfonucleares, as células endoteliais e do músculo liso, sendo as principais os monócitos e os macrófagos. A ativação destas células pelo LPS induz a produção de diversos mediadores, como do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e das interleucinas (IL)-1, 6, 8 e 10, dentre outras substâncias (VOGEL e HOGAN, 1990; DOBROVOSKAIA e VOGEL, 2002; ROTH et al., 2009), importantes para o desencadeamento das respostas inflamatória e febril.

## 1.2. MIGRAÇÃO CELULAR

A migração de leucócitos do sangue para dentro dos tecidos representa um dos mais importantes componentes da resposta inflamatória, pois possibilita o acesso destas células ao local injuriado.

Leucócitos circulantes migram dos vasos para os tecidos tanto em condições normais quanto em circunstâncias patológicas. Na inflamação, à medida que o fluxo sanguíneo se lentifica como decorrência da vasodilatação e do aumento da permeabilidade venular, os leucócitos saem da coluna central do fluxo e assumem uma posição mais periférica, passando a margear a superfície endotelial (marginação). Posteriormente, os leucócitos iniciam uma adesão transitória ao endotélio (rolagem) e, finalmente, interrompem seu trajeto em algum ponto onde possam aderir firmemente ao endotélio vascular. Uma vez aderidos, os leucócitos inserem pseudópodos nas junções entre as células endoteliais até que consigam atravessar a membrana e passar para o espaço extravascular (LAWRENCE e SPRINGER, 1991; VON-ADRIAN et al., 1991; LANGER e CHAVAKIS, 2009).

A direção da locomoção das células no espaço extravascular é determinada tanto pela fonte de atrativos/quimiotáticos no ambiente local (quimiotaxia) (KELLER et al., 1977), quanto pelo gradiente de proteínas ligantes adesivas na matriz celular (SCHWARZBAUER, 1997), sendo a região de maior densidade de proteínas mais favorável ao acúmulo de leucócitos (SPRINGER, 1995).

Neste contexto, vários receptores de adesão estão envolvidos nos processos de rolagem e adesão firme dos leucócitos ao endotélio vascular. Estes



pertencem a três famílias de moléculas de adesão: as selectinas, as integrinas e as imunoglobulinas.

Proteínas adesivas do tipo selectina são encontradas na maioria dos tipos celulares de origem hematopoiética e nas células endoteliais dos vasos sangüíneos e dos vasos linfáticos (BEVILACQUA e NELSON, 1993, ALBELDA et al., 1994). São conhecidos três membros da família das selectinas: a L-selectina (LAM-1, CD62L, Mel-14), expressa em leucócitos, a P-selectina, encontrada nas membranas dos grânulos densos das plaquetas e nos corpos de Weibel-Palade nas células endoteliais, e a E-selectina (ELAM-1, CD62), induzida somente em células endoteliais, e que como a P-selectina, liga-se a glicoproteínas superficiais presentes em leucócitos (MATSUBA et al., 1997; MALIK e LO, 1996; KLEIN et al., 1995; SCHOLZ et al., 1996). A característica de reversibilidade da ligação dos PMNs às selectinas é que garante a movimentação dessas células ao longo da parede dos vasos e, assim, sua remoção do fluxo sanguíneo (para revisão ver BROWN, 1997).

O sinal inicial para o próximo passo da transmigração endotelial de leucócitos, ou seja, a adesão firme ao endotélio, é postulado ser tanto um evento em resposta a uma citocina inflamatória quanto devido à propagação de sinais pelas selectinas ativadas. As selectinas podem atuar promovendo uma transição ordenada do fenômeno de rolagem para um processo envolvendo a expressão de integrinas, assegurando assim o sucesso da migração (ZIMMERMAN et al., 1996a; WILLIAMS e SOLOMKIN, 1999).

Integrinas são um grupo de proteínas transmembrânicas heterodiméricas encontradas em PMN e outras células hematopoiéticas, que medeiam a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (HYNES, 1992).

Existem três subfamílias das integrinas:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . A subfamília mais estudada é a das integrinas  $\beta_2$  (CD18), pois são proteínas presentes em todos os leucócitos, essenciais para a firme adesão destas células ao endotélio (CRONSTEIN e WEISSMANN, 1993). A ligação dos leucócitos ao endotélio é mediada primariamente por duas integrinas da família  $\beta_2$ . Estas são o antígeno de macrófago-1 (Mac-1), e o antígeno de função associada a linfócito-1 (LFA-1), a integrina predominantemente usada na migração de linfócitos. A expressão basal de LFA-1 é inalterada por ativadores ou estímulos, ao passo que Mac-1 pode ser rapidamente mobilizada das vesículas secretoras ou dos grânulos presentes nos PMN, após

estímulos destas células com formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), LPS e outros mediadores como o TNF- $\alpha$  (LUSCINSKAS e LAWLER, 1994; ALTIERI e EDGINGTON, 1988).

Estas integrinas dos leucócitos interagem com a terceira família de moléculas de adesão, envolvidas na adesão célula-célula, que é a superfamília das imunoglobulinas. Estas moléculas, presentes nas células endoteliais, contribuem para a adesão firme dos leucócitos ao endotélio ao se ligarem às integrinas. Dois membros da família das imunoglobulinas são ligantes para as integrinas de leucócitos: a molécula de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) (CRONSTEIN e WEISSMANN, 1993). VCAM-1 é encontrada em células endoteliais, mas apresenta seletividade pelas  $\beta_1$ -integrinas, sendo importante na migração de monócitos e eosinófilos. Já a ICAM-1, também encontrada nas células endoteliais, tem maior afinidade pela Mac-1 e é marcadamente induzida por citocinas inflamatórias, sendo então mais importante para a migração de PMN do que a VCAM-1 (para revisão ver WAGNER e ROTH, 2000; LANGER e CHAVAKIS, 2009).

O controle da síntese e/ou expressão destas moléculas de adesão é ditado em parte por sinais intracelulares e pela comunicação entre as próprias proteínas de adesão. No entanto, grande parte desta síntese e/ou expressão depende de mediadores presentes no local da inflamação.

Dentre os mediadores solúveis responsáveis pela migração celular estão citocinas como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , que são as duas mais importantes citocinas pró-adesivas presentes nas respostas inflamatórias. Os macrófagos/monócitos são a fonte principal dessas substâncias e o LPS talvez o mais importante indutor (revisado por TRACEY e CERAMI, 1993; TRACEY e CERAMI, 1994).

Leucócitos PMNs podem responder ao TNF- $\alpha$  ativando e expressando integrinas, produzindo fatores quimiotáticos como a IL-8 e o PAF (HUBER et al., 1991; KUIJPERS et al., 1992), e liberando o conteúdo de seus grânulos. Tanto o TNF- $\alpha$  quanto a IL-1 induzem a expressão de selectinas e ICAM-1 em células endoteliais e promovem ativação de integrinas em PMNs. ROMER et al., em 1995, demonstraram que monocamadas de células endoteliais ou PMN expostos *in vitro* ao TNF- $\alpha$  tiveram um aumento tempo e dose-dependente da expressão de

selectinas e integrinas. O mesmo foi observado por SCHOLZ et al., em 1996, após o tratamento com IL-1.

Dentre os principais fatores quimiotáticos induzidos por IL-1 e TNF- $\alpha$  estão as quimiocinas. As quimiocinas são uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas, que estimulam o movimento dos leucócitos e regulam a migração destes do sangue para os tecidos, além de estimular a produção de novas citocinas e auxiliar em diferenciações celulares. A quimiocina mais bem estudada é a IL-8, que é o estímulo primário para a migração de neutrófilos em muitas respostas inflamatórias. Roedores não apresentam IL-8 e acredita-se que seus análogos sejam as citocinas CINC (fatores quimiotáticos para neutrófilos induzidos por citocinas), que são similares a proteínas oncogênicas relacionadas ao crescimento de melanomas (WATANABE et al., 1993; NAKAGAWA et al., 1994). As CINC, especialmente a proteína inflamatória de macrófago (MIP)-2, são liberadas por macrófagos de ratos estimulados com LPS *in vitro* e possuem habilidades semelhantes a IL-8 de induzir quimiotaxia e degranulação de PMN (para revisão ver WAGNER e ROTH, 2000).

Num outro grupo de fatores quimiotáticos estão também alguns derivados de fosfolipídios de membrana, como o PAF e o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>).

O PAF é formado a partir da liso-gliceril-fosforil-colina, originado pela ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> sobre os fosfolipídios de membrana (BARNES et al., 1998). Pode ser produzido por células endoteliais, plaquetas, PMNs e macrófagos. Ele atua tanto em processos pró-inflamatórios quanto em pró-adesivos, ou seja, em adição à quimiotaxia, o PAF tem importância na firme adesão de PMNs ao endotélio vascular (ZIMMERMAN et al., 1996b).

Os leucotrienos são produzidos, predominantemente, por células inflamatórias como PMN, macrófagos e mastócitos, ativadas por complexos imunes, peptídeos bacterianos, dentre outros estímulos. Eles são formados pela ação da enzima 5-lipoxigenase sobre o ácido araquidônico, liberado dos fosfolipídios de membrana pela ação também da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (FUNK, 2001). Somente o leucotrieno da série B<sub>4</sub> tem ação quimiotática. Ele está presente na maioria dos focos inflamatórios e é de 10 a 1000 vezes mais potente que o PAF em induzir quimiotaxia de PMN (NOHAWA et al., 1997; RIBEIRO et al., 1997).

Outros derivados do ácido araquidônico como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos C<sub>4</sub> e D<sub>4</sub> não são considerados quimiotáticos, mas podem colaborar

para o processo de migração celular porque promovem vasodilatação e aumentam, assim, o fluxo sanguíneo local, facilitando o acesso de neutrófilos e monócitos ao sítio inflamatório (BARNES et al., 1998).

Dois outros importantes quimiotáticos para neutrófilos são: a proteína C5a do sistema complemento e o  $\alpha$ MLP. C5a extravascular promove transmigração endotelial dependente do gradiente de concentração da substância; pode também promover degranulação destas células (KOHL e BITTER-SUERMAN, 1993). O  $\alpha$ MLP é um peptídeo bacteriano, resultante da clivagem das porções  $\text{NH}_2$ - terminal de proteínas bacterianas durante a síntese das mesmas. Como o C5a, o  $\alpha$ MLP exerce atividades pluripotentes nos PMN, incluindo a degranulação, o “burst” oxidativo (geração de ânions superóxido), a quimiotaxia e o aumento das respostas a outros ativadores (BORREGAARD e COWLAND, 1997).

Os mecanismos envolvendo a migração direcionada dos leucócitos no espaço intersticial, num microambiente pato/fisiológico, ainda não estão completamente esclarecidos. Alguns estudos mostram que, a partir do momento em que os leucócitos, especialmente os neutrófilos, detectam um gradiente quimiotático, eles alteram suas formas tornando-se morfologicamente orientados para o gradiente e passam a migrar de uma maneira curvilínea sem pausas distintas (ZIGMOND, 1978; KAY, et al., 2008). A resposta quimiotática é tão eficiente que a célula pode sentir uma diferença de concentração de apenas 1% sobre a superfície celular (ZIGMOND, 1977). Recentemente, KHANDOGA et al. (2009) verificaram que após a exposição de leucócitos a agentes quimiotáticos, como o  $\text{MIP-1}\alpha$  e o PAF, ocorre um aumento significativo na extensão de adesão ao endotélio e da migração dessas células para o espaço intersticial, caracterizada por uma aumento na velocidade de migração direcionada, em linha reta/direta, aos estímulos. No sítio inflamatório/infeccioso, por sua vez, a alta concentração de quimiotáticos faz com que os neutrófilos desencadeiem os processos de fagocitose (BROWN, 1995), exocitose dos grânulos que contêm proteases (TAPPER, 1996) e geração de ânions superóxido (CHANOCK et al., 1994), a fim de destruir o(s) agente(s) agressor(es).

Os macrófagos residentes são considerados como células de alarme, responsáveis pelo início da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (FERREIRA, 1980). A maioria dos macrófagos residentes deriva de monócitos circulantes, os quais são provenientes da divisão de células precursoras, os monoblastos, na medula óssea. Quando os monócitos deixam o sangue circulante e

entram nos tecidos, tornam-se macrófagos. Os macrófagos teciduais incluem as células de Kupffer no fígado, os macrófagos dos alvéolos pulmonares, os osteoclastos, a microglia no cérebro, os macrófagos da camada serosa do intestino, linfonodos, baço, articulações (células sinoviais), pele (células de Langerhans) e no endotélio (células dendríticas). Devido a sua abundância, distribuição, motilidade e responsividade, os macrófagos podem influenciar diversos aspectos das respostas imune e inflamatória (LASKIN e PENDINO, 1995).

SOUZA et al., em 1988, observaram que quando há depleção dos macrófagos residentes na cavidade peritonial, a migração de neutrófilos induzida por diversos estímulos como carragenina, zimosan ou LPS, é reduzida. O mesmo foi observado por RIBEIRO et al. (1997) em animais estimulados com  $LTB_4$ . Estes dados reforçam a importância dos macrófagos para a migração de PMN pois, uma vez que essas células são as principais produtoras de substâncias reguladoras da migração celular (VOGEL e HOGAN, 1990; DOBROVOSKAIA e VOGEL, 2002), uma diminuição no número das mesmas reduziria a produção de mediadores como o  $TNF-\alpha$  e a IL-1, necessários ao desencadeamento da migração de PMNs.

Além de participar efetivamente do fenômeno de migração celular, os macrófagos exercem um papel relevante no desenvolvimento da resposta febril induzida periféricamente, pois ambas as respostas compartilham de mediadores comuns, provenientes da estimulação destas células.

### 1.3. RESPOSTA FEBRIL E REAÇÃO DE FASE AGUDA

O sistema imune e o sistema nervoso são ambos desenvolvidos para perceber e responder a estímulos físicos e químicos, gerados dentro e fora do organismo. As células dos sistemas imune e nervoso comunicam-se através de estruturas de superfície (moléculas de adesão celulares e receptores) e de mediadores solúveis (hormônios, citocinas, neurotransmissores) (NEUMANN e WEKERLE, 1998).

Citocinas pró-inflamatórias como o  $TNF-\alpha$  e as  $IL-1\alpha$  e  $IL-1\beta$  e IL-6, liberadas por células inflamatórias, como os macrófagos, em resposta a um agressor (JANEWAY et al., 1999), têm um papel no local da injúria, como citado anteriormente, mediando a defesa imune, mas também sinalizam para o sistema

nervoso central (SNC) iniciar as respostas de defesa mediadas centralmente, como a febre (HANSEN et al., 2001).

A febre pode ser considerada como parte de uma complexa estratégia de defesa do organismo contra microorganismos ou qualquer substância reconhecida como estranha pelas células imunes, sendo considerada o elemento chave da reação de fase aguda (RFA). Os benefícios da febre incluem o aumento da fagocitose, da migração de neutrófilos, da proliferação de células T e da produção de radical superóxido, aumento da síntese e da atividade de interferons, e diminuição da viabilidade e crescimento de bactérias dependentes de ferro (BLATTEIS e SEHIC, 1998).

Em adição à febre, a RFA é caracterizada pelo aumento no número de leucócitos periféricos, especialmente de neutrófilos e seus precursores. Ao mesmo tempo, são observadas alterações bioquímicas, como a indução da síntese hepática de proteínas de fase aguda, alterações fisiológicas, como na termorregulação, na atividade do sistema endócrino, na ingestão de alimentos, nas fases do sono e alterações de comportamento (para revisão, ver ZEISBERGER, 1999). É importante ressaltar que a RFA não é desencadeada pelos efeitos dos microorganismos ou das toxinas em si, mas, sim, pela liberação dos mediadores das células inflamatórias ativadas, após contato com pirógenos exógenos, como o LPS.

A administração de LPS a animais de laboratório representa um dos modelos clássicos de indução da resposta febril, mimetizando o que ocorre naturalmente nos processos infecciosos. Seus efeitos são mais uniformes do que aqueles induzidos pela administração de bactérias.

O LPS estimula células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos) induzindo a liberação de citocinas e/ou pirógenos endógenos (PE) que, por sua vez, induzem febre (DINARELLO, 1999).

Existem muitas evidências de que a febre induzida pelo LPS é mediada por inúmeros PE produzidos tanto centralmente quanto periféricamente. Entre esses pirógenos estão as IL-1 $\beta$  e  $\alpha$  (DINARELLO, 1984; 1994), a IL-6 (HELLE et al., 1988; SOUZA et al., 2002; HARRE et al., 2002), o TNF- $\alpha$  (DINARELLO et al., 1986), a IL-8 (ZAMPRONIO et al., 1994), o MIP-1 $\beta$  (DAVATELIS et al., 1989; MIÑANO et al., 1990; 1997), fator-pirrogênico pré-formado de macrófago (PFPF) (ZAMPRONIO et al., 2000), fator liberador de corticotrofina (CRF) (ZAMPRONIO et al., 2000; SOUZA

et al., 2002), o MIP-2 (MIÑANO, et al., 2004), as endotelinas (ET) (FABRÍCIO et al., 1998; 2005; 2006), as prostaglandinas (PG) (MORIMOTO et al., 1992; SOUZA et al., 2002; RUMMEL et al., 2005), os opióides endógenos (BENAMAR et al., 2000; FRAGA, 2004) e, possivelmente, os endocanabinóides (BENAMAR, et al., 2007) e a substância P (SZÉKELY et al., 2000).

Uma vez liberados, os PE levam a informação à área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO/HA), para que a mesma seja traduzida em um sinal neural, causando, assim, uma alteração no sistema de termorregulação que resulta em febre (ROTHWELL, 1990). No entanto, existem vários indícios de que a elevação do termostato hipotalâmico deve-se à indução pelos PE de mediadores centrais.

Os mediadores centrais da resposta febril identificados até o momento são: as prostaglandinas  $PGE_2$  e  $PGF_{2\alpha}$ , o fator liberador de corticotropina (CRF) (VANE, 1971; STRIJBOS et al., 1992), os opióides endógenos (FAGARASAN et al., 1990; FRAGA, 2004) e a endotelina-1 (ET-1) (NAMBI et al., 1994).

A  $PGE_2$ , quando administrada pela via intracerebroventricular (icv), induz febre por atuar em neurônios sensíveis a variações de temperatura no hipotálamo, estimulando diretamente a termogênese (MURAKAMI e WATANABE, 1989; DINARELLO, 1991). O receptor EP3 parece ser o mais importante para as ações da  $PGE_2$  na gênese da febre (USHIKUBI et al., 1998).

A  $PGF_{2\alpha}$  também induz um aumento na temperatura corporal de ratos e coelhos quando administrada via icv (MORIMOTO et al., 1988; ROTHWELL, 1990). Após administração de endotoxina é observado um aumento na concentração dessa PG no fluido cerebrospinal (COELHO et al., 1995).

Outro mediador central da resposta febril é o CRF. Quando este peptídeo é administrado por via icv em ratos, ocorre um grande e rápido aumento da taxa metabólica e estimulação da atividade termogênica do tecido adiposo marrom, elevando, assim, a temperatura corporal destes animais (BROWN et al., 1982; LeFEUVRE et al., 1987; DIAMANT e DE WIED, 1991).

ROTHWELL (1990; 1991) sugeriu que os efeitos pirogênicos de citocinas como IL-1 $\beta$  e IL-6 e da  $PGF_{2\alpha}$  são mediados pelo CRF, visto que o CRF<sub>9-41</sub>, antagonista deste peptídeo, foi capaz de reverter o aumento da temperatura corporal induzido por essas substâncias. Este mesmo efeito do CRF<sub>9-41</sub> foi observado por ZAMPRONIO et al. (1994) na resposta febril induzida pela IL-8, enquanto as

respostas da IL-1 $\alpha$  e do TNF- $\alpha$  não foram modificadas por este antagonista, demonstrando que estas citocinas dependem apenas de PG.

Outro peptídeo capaz de aumentar a temperatura corporal de animais, tanto administrado periféricamente (KOSHI et al., 1992) quanto centralmente (FABRICIO et al., 1998) é a endotelina-1 (ET-1). Estes autores observaram que a administração do antagonista inespecífico deste peptídeo (Bosentan) foi capaz de reduzir a resposta febril do LPS em ratos. Além disso, com a administração de antagonistas específicos, verificou-se que o receptor ET<sub>B</sub> é responsável pelas ações deste peptídeo na febre. A ativação dos receptores ET<sub>A</sub> da ET-1 parecem não estar envolvidos na resposta febril do LPS (FABRICIO et al., 1998).

Quanto à participação da ET-1 como mediador central da resposta febril, FABRICIO et al. (2006) observaram que o antagonista de receptor ET<sub>B</sub> reduziu a febre induzida pelo CRF e pelo PFPF, mas não modificou a febre induzida por IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 ou pelas PG (FABRICIO et al., 2005b).

Considerando os dados mencionados acima, observa-se que as PGE<sub>2</sub> são os mediadores finais da via da IL-1 $\alpha$  e do TNF- $\alpha$  (KOMHOFF et al., 1997; CAO et al., 1997; MAJERUS, 1998). Já a IL-1 $\beta$  e a IL-6 dependem das PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  e do CRF (ROTHWELL, 1991), enquanto a IL-8 tem como mediador final apenas o CRF (ZAMPRONIO et al., 1994). Os opióides endógenos parecem ser liberados após síntese/liberação de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , CRF e ET-1, ativando receptores  $\mu$ , como observado por FRAGA (2004).

#### 1.4. RESPOSTA FEBRIL E NERVO VAGO

As citocinas produzidas periféricamente podem exercer seus efeitos no sistema nervoso central (SNC) através de vários mecanismos distintos: podem ser transportadas ativamente por carreadores específicos da circulação sangüínea para dentro do SNC (BANKS et al., 1995; MANESS et al., 1998); podem entrar diretamente onde a barreira hematoencefálica é mais vulnerável - através dos órgãos circumventriculares, como por exemplo, pelo *organum vasculosum da laminae terminalis* (OVLT) (BLATTEIS et al., 1983; KOMAKI et al., 1992); podem enviar sinais através do tráfego linfóide (NEUMANN e WEKERLE, 1998); podem atuar em seus receptores presentes nas células da glia ou nas células endoteliais,



induzindo assim a síntese de prostaglandinas na interface da barreira hematoencefálica, sem penetrar no SNC (MATSUMURA et al., 1998); podem ligar-se a receptores nos terminais aferentes vagais ou em estruturas próximas a estes, ativando-os (NIIJIMA, 1996; GOEHLER et al., 1997).

Muitas evidências sugerem que tanto as fibras vagais aferentes (SZÉKELI et al., 2000; KOULCHITSKY, 2000) quanto as eferentes (ROMANOVSKY et al., 2000), têm importante papel sinalizador entre o sítio inflamatório e o cérebro. No entanto, alguns estudos mostram o nervo vago desempenhando um papel pró-inflamatório, enquanto outros revelam um papel antiinflamatório para este nervo (para revisão ver ROMANOVSKY, 2000; PAVLOV e TRACEY, 2005; BLATTEIS, 2006).

MOHANKUMAR et al. (2000) verificaram que a vagotomia subdiafragmática atrasa em uma hora, mas não bloqueia, a indução da resposta febril pela administração intraperitoneal de 10 µg/kg de LPS. Entretanto a resposta febril induzida pela administração intraperitoneal de 50-200 µg/kg de LPS foi atenuada pela vagotomia subdiafragmática (TUREK et al., 2005; WERNER et al., 2003).

Num outro estudo, foi observado que a realização de vagotomia subdiafragmática em ratos não modifica a resposta febril induzida pela administração intraperitoneal de LPS, nas doses de 1, 10 ou 50 µg/kg (HANSEN et al., 2000). Esses autores verificaram que após a administração de todas as doses de LPS utilizadas, quantidades significativas de IL-1β foram detectadas no soro, no fígado e na hipófise desses animais, tornando possível que essa citocina circulante envie sinais para o cérebro independentemente das fibras aferentes vagais, induzindo, então, a febre. Corroborando para essa hipótese, em um estudo posterior HANSEN et al. (2001) demonstraram que a vagotomia subdiafragmática pode ou não bloquear a febre induzida por injeção intraperitoneal de IL-1β, observando que o bloqueio da resposta febril é dependente da dose de IL-1β utilizada. Em doses baixas de IL-1β, como 0,1 µg/kg, a vagotomia bloqueia completamente a febre induzida por esta citocina, sendo, entretanto, ineficaz frente a uma dose de 1 µg/kg de IL-1β. Após a administração de 0,1 µg/kg de IL-1β, quantidades mínimas de IL-1β foram detectadas no soro e na hipófise dos animais; e provavelmente insuficientes para induzir febre por outras vias que não a dependente do nervo vago.

Em 2003 foi demonstrado em nosso laboratório que a integridade do nervo vago é importante, não somente para a febre, mas também, para o influxo de

neutrófilos para a cavidade peritoneal, através do controle do número de células residentes nesta cavidade (WERNER et al., 2003). Em 2005 foi evidenciada a importância do neurotransmissor vagal acetilcolina, uma vez que o tratamento de animais com tubocurarina, um antagonista do receptor nicotínico da acetilcolina, reduziu o número de mononucleares residentes na cavidade peritoneal, a migração de neutrófilos, a resposta febril induzidas por LPS, e a liberação *in vitro* de TNF- $\alpha$  por macrófagos residentes (POCHAPSKI, 2005). Juntos esses dados sugerem um papel pró-inflamatório do nervo vago atuando através deste neurotransmissor.

No entanto, BOROVIKOVA et al. (2000) observaram que a acetilcolina diminui significativamente *in vitro*, através de receptores nicotínicos, a liberação de citocinas, como o TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-18, em cultura de macrófagos humanos estimulados com LPS. Nesse mesmo estudo, os autores verificaram que a síntese/liberação de TNF- $\alpha$  por hepatócitos e por células sanguíneas após a injeção de LPS em ratos, mostrava-se aumentada em animais vagotomizados, e que este aumento podia ser bloqueado pela estimulação elétrica do vago. O mesmo grupo de pesquisadores confirmou que o receptor nicotínico da ACh regula a síntese de citocinas. Posteriormente, WANG et al. (2004) demonstraram que a subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico parece estar envolvida na sinalização colinérgica, via nervo vago, para macrófagos e outras células produtoras de citocinas. Esses autores observaram que um agonista não-seletivo dos receptores nicotínicos  $\alpha 7$  foi efetivo no tratamento de endotoxemia e sepsis experimental (para revisão ver PAVLOV e TRACEY, 2005). Desta forma, contrapondo aos nossos estudos, a acetilcolina liberada pelo nervo vago atenuaria a resposta inflamatória. Porém, enquanto WERNER et al. (2003) e POCHAPSKI (2005) utilizaram doses baixas de LPS, BOROVIKOVA et al. (2000) procuraram em seu estudo simular choque séptico, utilizando altas doses.

Desta forma, as incoerências observadas entre alguns estudos, provavelmente, decorrem das diferentes condições experimentais utilizadas, como dose das substâncias, procedimento cirúrgico e outras. E de uma maneira geral, esses estudos sugerem que as fibras vagais têm um papel relevante no desencadeamento da resposta febril quando os pirogênicos encontram-se em pequenas quantidades, ou seja, ao se utilizarem doses baixas, e quando injetados por via intraperitoneal. Quando a administração do pirogênio é feita por via

intravenosa, parece que somente a integridade da fibra vagal hepática é necessária para o desenvolvimento de febre, como verificado por SIMONS et al. (1998), após a administração intravenosa de LPS (1 µg/kg).

Considerando que o nervo vago não é composto somente de fibras eferentes que liberam acetilcolina, mas também por fibras aferentes do tipo C e Aδ que contêm vários neuropeptídeos, dentre eles a Substância P (ICHIKAWA e HELKE, 1997), é possível que este neuropeptídeo também participe da modulação das respostas inflamatória e febril.

### 1.5. SUBSTÂNCIA P

A substância P foi descoberta em 1931 por von Euler e Gaddum. É um neuropeptídeo formado por 11 aminoácidos, com a seguinte sequência: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>.

Nos mamíferos, a substância P é derivada do gene Pre-pro-taquicinina A (PPTA). Este gene codifica outras taquicinas, incluindo a neurocinina A, neuropeptídeo K e neuropeptídeo Y (CARTER e KRAUSE, 1990). O *splice* alternativo do gene PPTA transcrito resulta em três ácidos ribonucleicos mensageiros (RNAm). Todos os três possuem a sequência codificadora para o precursor da substância P (NAKANISHI, 1987). A substância P é liberada de seu precursor pela ação de proteases, chamadas convertases. Sua síntese ocorre nos corpos celulares de neurônios, no retículo endoplasmático. Após, é transferida para o complexo de Golgi onde é armazenada em vesículas e, então, transportada axonalmente para as terminações nervosas (BRIMIJOIN et al., 1980; MERIGHI, et al., 1988; DIKEAKOS e REUDELHUBER, 2007).

O metabolismo da substância P é realizado por diversas enzimas como a endopeptidase neutra, a enzima conversora de angiotensina, catepsina D e E (para revisão ver HARRISON e GEPPETTI, 2001).

A substância P é um neuropeptídeo encontrado, principalmente, no sistema nervoso central (SNC) e periférico. Altas concentrações de substância P são encontradas na substância negra, no mesencéfalo, na região pre-óptica do hipotálamo, dentre outras. Na periferia, a substância P é encontrada nos aferentes primários (fibras Aδ e C, sensíveis à capsaicina), que estão envolvidas na transmissão de estímulos nocivos (OTSUKA e YOSHIOKA, 1993).

Embora a substância P seja descrita como um peptídeo de origem neuronal, estudos em roedores têm demonstrado sua produção por células imunes, presentes no processo inflamatório, como macrófagos, eosinófilos, linfócitos e células dendríticas (WEINSTOCK et al., 1988; BOST et al., 1992; KILLINGSWORTH et al., 1997; JOOS et al., 2000).

As ações da substância P são mediadas, principalmente, através de receptores NK1 (afinidade: 0,05-0,5 nM), que são receptores do tipo “metabotrópicos”, acoplados a proteína G (REGOLI et al., 1994). Sua ligação ao receptor promove uma rápida endocitose e internalização, o que contribui para a dessensibilização das células à sinalização pela substância P. Até o momento foram identificadas duas isoformas do NK1 que parecem contribuir de maneira diferente para os efeitos da substância P sobre o sistema imune (para revisão, ver TULUE et al., 2009).

ROUSH e KWATRA (1998) evidenciaram que este receptor pode estar acoplado às proteínas  $G_{q/11}$ ,  $G\alpha_s$  e  $G\alpha_o$ . Assim, a estimulação deste receptor pode levar a ativação da fosfolipase  $C_\beta$ , resultando num aumento transiente de inositol 1,4,5-trifosfato e cálcio; ativação da fosfolipase  $A_2$ , resultando num aumento da mobilização de ácido araquidônico; e ativação da adenilato ciclase, promovendo um acúmulo de AMPc (TAKEDA et al., 1992; GARCIA et al., 1994).

No SNC, a expressão dos receptores NK1 é elevada no núcleo caudado-putâmen e moderada no hipocampo, hipotálamo, córtex cerebral e outras regiões. Na periferia, são encontrados, principalmente, em gânglios da raiz dorsal e nos neurônios intrínsecos do intestino (para revisão ver HARRISON e GEPPETTI, 2001). Porém, células como macrófagos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos também expressam receptores NK1 funcionais (HO et al., 1997; LAI et al., 1998; COOKE et al., 1998; LAMBRECHT et al., 1999).

Nos últimos anos, muitos esforços foram empregados para o desenvolvimento de potentes e seletivos antagonistas dos receptores NK1 (CELLIER et al., 1999), de natureza peptídica e não-peptídica, o que possibilitou avaliar o papel da substância P em vários sistemas do organismo. Utilizou-se neste trabalho o antagonista não-peptídico seletivo para os receptores NK1, SR140333, fornecido pela Sanofi-Aventis (França).

Existem diversos estudos mostrando a participação da substância P nas respostas inflamatória e febril, assim como modelos experimentais com capsaicina,

que sugerem que a substância P tem um papel importante na comunicação do SNC com o sistema imune (para revisão ver BLACK, 2002).

YARAE et al. (2003) e DELGADO et al. (2003) verificaram que a substância P é capaz de ativar macrófagos, linfócitos e granulócitos de camundongos e ratos, e induzir um aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias por essas células, o que poderia contribuir para o desenvolvimento da inflamação e da febre. Esse aumento na liberação de citocinas parece ser decorrente da ativação rápida e aumentada do fator de transcrição NF- $\kappa$ B pela substância P, como observado por MARRIOT et al. (2000), em macrófagos. Considerando que o LPS, ao formar um complexo com a proteína ligante de LPS (LBP) (RAETZ et al., 1991), induz a fosforilação de diversas proteínas quinases e a mobilização de NF- $\kappa$ B, induzindo, assim, a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (TAKEDA e AKIRA, 2005), é possível que exista um sinergismo entre esta endotoxina e a substância P, para o desencadeamento da resposta inflamatória. Corroborando para essa hipótese, BERMAN et al., em 1996, verificaram que a pré-incubação de macrófagos peritoniais de ratos com substância P aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias, induzidas por LPS.

O tratamento de ratos com o antagonista seletivo de receptores NK1, SR140333, reduziu significativamente a migração de leucócitos totais, de neutrófilos e outras células para a cavidade peritoneal, quatro horas após a indução por 1,25% de formalina (SANTOS et al., 2004). O mesmo antagonista também reduziu significativamente a migração de leucócitos totais e neutrófilos no modelo de pleurisia, induzida por veneno de *P. nigriventer* (PVN) (COSTA et al., 2002), evidenciando assim a participação da substância P na resposta inflamatória. É possível que esses autores tenham utilizado a formalina e o PVN como estímulo, devido à capacidade dos mesmos de exercer inúmeros efeitos no sistema nervoso periférico, inclusive nas fibras C e A $\delta$ , ricas em substância P.

BOST et al. (1992) verificaram que a expressão de mRNA para pré-protaquicininas (precursoras das taquicininas como a substância P e a neurocinina A), e a expressão de mRNA para o receptor NK1, estava aumentada em macrófagos peritoniais de ratos, estimulados *in vitro* com LPS. Além disso, a habilidade dos macrófagos em secretar substância P imunorreativa também foi observada. Esses autores sugerem que os macrófagos regulam sua própria função e de células

vizinhas, via substância P/NK1. No entanto, faltam evidências que comprovem a relevância deste controle in vivo.

ELEKES et al. (2007) verificaram que animais expostos ao LPS apresentaram maiores níveis de substância P nos pulmões, sugerindo que este neuropeptídeo possa estar contribuindo para o acúmulo de leucócitos, observado após a administração da endotoxina.

A substância P também parece estar envolvida no desenvolvimento da resposta febril, porém seu papel nesta resposta ainda não foi completamente elucidado.

Diversos autores observaram que a administração central de substância P causa um aumento no índice metabólico, uma diminuição na perda de calor e, conseqüentemente, uma elevação regulada da temperatura corporal (BLATTEIS et al., 1994; SZELÉNYI et al., 1997; BALASKÓ et al., 2000); o que demonstra que este neuropeptídeo apresenta efeitos termorregulatórios e que pode, assim, modular a febre centralmente. Corrobora para isto o fato de que a substância P é capaz de aumentar a atividade de neurônios hipotalâmicos da área pré-óptica insensíveis e, em menor grau, sensíveis à temperatura; e que a administração de um antagonista bloqueia a resposta excitatória desencadeada pela substância P em alguns neurônios, em ratos anestesiados (SHIBATA et al., 1988).

Existem também alguns estudos mostrando que a administração prévia de antagonistas de substância P reduz a resposta febril induzida por LPS (BLATTEIS et al., 1994, BALASKÓ et al., 2000). Dados de uma revisão publicada por BLATTEIS (1992) sugerem que os pirógenos endógenos circulantes, induzidos por LPS por exemplo, provavelmente, não entram no cérebro, mas interagem com elementos sensoriais na OVLT, e que a substância P seria um dos neurotransmissores envolvidos.

Desta forma, considerando os trabalhos mencionados acima, é possível que a substância P endógena seja um mediador importante das respostas inflamatória e febril promovidas pelo LPS.

## 1.6. JUSTIFICATIVA

Os trabalhos relatados mostram que a substância P, originária ou não das fibras aferentes A $\delta$  e C, participa das respostas inflamatória e febril. Entretanto, faltam estudos que relacionem os efeitos da substância P sobre células imunes residentes, com seus efeitos na inflamação e na febre, particularmente quando estas respostas são desencadeadas pela administração de LPS. Isto é importante porque, como mencionado anteriormente, o curso dessas respostas depende dos mediadores (citocinas, peptídeos) liberados no local da injúria, por estas células.

## **2. OBJETIVO**



Este estudo tem como objetivos avaliar a importância da substância P endógena liberada perifericamente através do bloqueio dos receptores NK1, para a manutenção de células residentes na cavidade peritoneal, migração celular e resposta febril induzidas por lipopolissacarídeo (LPS); e avaliar o papel da substância P liberada no sistema nervoso central na resposta febril induzida pela administração periférica de LPS e central de interleucina (IL)-1 $\beta$ .

## 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do antagonista seletivo do receptor NK1, SR140333, administrado perifericamente sobre:
  - A resposta febril induzida por LPS;
  - A temperatura corporal basal;
  - O extravasamento plasmático induzido por substância P e por LPS;
  - O número de células residentes na cavidade peritoneal;
  - A migração celular induzida por LPS.
- Avaliar se a substância P administrada perifericamente induz migração celular.
- Avaliar o efeito do SR 140333 administrado no sistema nervoso central sobre:
  - A elevação da temperatura corporal induzida pela administração intracerebroventricular de substância P;
  - A resposta febril induzida pela administração periférica de LPS;
  - A temperatura corporal basal;
  - A resposta febril induzida pela administração intracerebroventricular de IL-1 $\beta$ .

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos, pesando entre 160-220 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a ração e água, antes dos experimentos. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação no mínimo 2 dias antes dos experimentos e foram agrupados em um número máximo de 5 animais por caixa. Os experimentos foram realizados entre 07:00 e 19:00 h. Os procedimentos utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética da UFPR, protocolo número 173.

### 3.2. ESTERILIZAÇÃO

Os materiais foram autoclavados a  $127^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos, ou adquiridos estéreis.

### 3.3. DROGAS E SOLUÇÕES

- Acrílico auto-polimerizante Policron - Dencril Ltda., BR
- Cetamina – Fort Dodge, BR
- IL-1 $\beta$  - rr-NIBSC, Inglaterra
- Lidocaína 2% inj. com noradrenalina – Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda., BR
- Lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* 0111:B4 – Sigma Chemicals & Co, EUA
- SR140333B (cloreto de (S)-1-[2-[3-(3,4-diclorofenil)-1 (3-isopropoxi-feniacetil) piperidin-3il] etil]-4-fenil-1 azaniabicyclo[2.2.2] octano) - doação da Sanofi-Aventis, França
- Substância P – Sigma Chemicals & Co, EUA
- Terramicina<sup>®</sup> – Pfizer, BR
- Tween 80 – Merck, BR
- Xilasina 2% s/v - Synthec do Brasil, BR

- Albumina bovina 3%
  - albumina bovina fração V (Merck) ----- 3 g
  - PBS 10% ----- 100 mL
- Azul de pontamida
  - azul de pontamida (Merck) ----- 1 g
  - soro fisiológico ----- 100 mL
- Corante pancrômico de Rosenfeld
  - azul de metileno giemsa (Merck) ----- 0,97 g
  - azul de metileno may-grounwald (Merck) ----- 0,53 g
  - metanol P. A. (Merck) ----- 1 litro
- Líquido de Turk
  - ácido acético glacial ----- 15 mL
  - azul de metileno (Merck) ----- 1 mg
  - água milli-Q ----- q.s.p. 500 mL
- Solução salina tamponada fosfatada (PBS) - pH 7,4
  - NaCl ----- 80 g
  - KCl ----- 2 g
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ----- 14,4 g
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ----- 2 g
  - água milli-Q ----- q.s.p. 1 litro

Procedência dos sais: Merck - BR

- Solução salina estéril 0,9% - Halex Istar, BR

### 3.4. AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS NA CAVIDADE PERITONIAL

Para contagem do número de células na cavidade peritoneal (CP), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade abdominal foi lavada com 10 ml de PBS, contendo albumina 0,03% (p/v) e 5U/mL de heparina. Foi coletado o maior volume possível de fluido. Para a contagem global de leucócitos em câmara de Neubauer, o fluido peritoneal foi diluído em solução de Turk (para lisar as hemácias presentes no mesmo) e, para a diferenciação das células em mononucleares, neutrófilos, eosinófilos e basófilos, o fluido foi centrifugado (1000g, 10 min, 4°C). Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em albumina

bovina 3% e colocadas em lâminas cobertas com papel para centrífuga contendo dois orifícios, para serem coradas com o corante Pancrômico de Rosenfeld e analisadas sob microscopia de luz. O número de células foi expresso como média  $\pm$  EPM / mL de fluido peritonial.

### 3.5. AVALIAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO

Os animais foram anestesiados com éter e azul de Evans (AE, 30 mg/kg) foi administrado intravenosamente no seio venoso peniano. O dorso dos animais foi, então, depilado para a administração intradérmica dos estímulos e do controle (salina estéril). Estes foram administrados em um volume de 50  $\mu$ L em sítios distintos, distantes entre si no mínimo 2 cm. Os animais foram, então, sacrificados e as áreas da pele onde ocorreu o extravasamento (a área azul ao redor de cada sítio de aplicação) foram coletadas para a avaliação colorimétrica do extravasamento do AE.

O AE foi extraído com formamida, através da homogeneização do tecido e incubação em formamida por 24 h em estufa a 37°C. Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 2000 g, por 15 min a 25°C. A quantidade de AE em cada tecido foi obtida pela projeção da densidade óptica das amostras, numa curva linear padrão de AE, medida no comprimento de 620 nm (Meridian Diagnostic EL x 800, Cincinnati, OH). O extravasamento plasmático foi expresso como média  $\pm$  EPM da quantidade de AE extravasado, em  $\mu$ g.

### 3.6. IMPLANTE DO REGISTRADOR REMOTO DE TEMPERATURA NA CAVIDADE PERITONIAL

Os registradores remotos de temperatura utilizados neste trabalho foram adquiridos da *SubCue Dataloggers*, Calgary, Canadá. Têm um peso aproximado de 4,2 g, diâmetro de 1,5 cm e espessura de 0,5 cm.

Um dia antes do implante na cavidade peritonial, os registradores remotos de temperatura foram programados para iniciar o registro de temperatura no dia do experimento (6 a 7 dias após). Em seguida, o ponto de conexão dos mesmos com o computador foi protegido com silicone biodegradável. No dia seguinte, os animais

foram anestesiados com cetamina (60 mg/kg) e xilasina (7,5 mg/kg), via intraperitoneal (ip). Após tricotomia e anti-sepsia da pele da região ventral, foi realizada uma incisão na pele, e posterior incisão da camada muscular e peritoneal, para colocação dos registradores na cavidade peritoneal. As camadas foram então suturadas, separadamente, com fio cirúrgico de algodão 3-0. Após a cirurgia, os animais receberam injeção de oxitetraciclina - Terramicina (400 mg/kg, sc). As temperaturas foram tomadas em intervalos de 15 minutos, por um período de 7 horas.

### 3.7. IMPLANTE DA CÂNULA NO VENTRÍCULO LATERAL

Para a administração no sistema nervoso central do captopril, da substância P, do SR 140333 e da IL-1 $\beta$  foi implantada uma cânula no ventrículo lateral direito.

Ambos os procedimentos (implante do registrador de temperatura e da cânula intracerebroventricular) foram realizados no mesmo dia, sob anestesia com cetamina e xilasina, conforme descrito anteriormente.

Após tricotomia e anti-sepsia da pele, as cabeças dos ratos foram imobilizadas em um aparelho estereotático (David-Kopf, modelo 900-USA). Foram administrados, por via subcutânea (sc), 0,2 mL de lidocaína a 2% com noradrenalina, na parte superior da cabeça, seguida de uma incisão de aproximadamente 1 cm de diâmetro na pele, para exposição da calota craniana.

Após a localização do bregma, tomado como ponto de referência, os parâmetros estereotáticos utilizados para a perfuração do crânio e implantação da cânula no ventrículo lateral foram de -0,8 mm anteroposterior e -1,5 mm lateralmente, sendo a inclinação da barra incisal de -3,3 mm.

As cânulas esterilizadas, constituídas de um segmento de agulhas hipodérmicas BD, com 13 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro, foram conectadas por meio de um segmento de polietileno PE-50 a uma cânula guia, fixada ao estereotático, e introduzidas no tecido cerebral com coordenada ventral a 2,5 mm abaixo da superfície craniana. As coordenadas foram determinadas com base no atlas de PAXINOS & WATSON (1986).

Após sua introdução no tecido cerebral, as cânulas foram fixadas utilizando-se uma prótese de acrílico auto-polimerizável, com o auxílio de dois parafusos

rosqueados à calota craniana. Os experimentos foram conduzidos entre 6 e 7 dias após o procedimento cirúrgico, para permitir a recuperação dos animais.

A fim de se verificar a posição da cânula, após o término dos experimentos de avaliação da resposta febril, os animais foram anestesiados com éter e receberam 3  $\mu$ L do corante azul de pontamida, no local correspondente à microinjeção. Em seguida, os ratos foram decaptados e os encéfalos extraídos, cortando-se transversalmente a região correspondente à localização da cânula, sendo o local da microinjeção verificado macroscopicamente.

Os animais onde a injeção do corante mostrou-se fora do ventrículo lateral ou que apresentarem um padrão anormal de ganho de peso foram excluídos dos experimentos.

### 3.8. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram ambientados no local, no mínimo 48 horas antes dos experimentos. A temperatura da sala foi mantida em  $22 \pm 2$  °C.

Em todos os experimentos onde o SR140333 foi administrado pela via intraperitoneal (ip), doses de 0,3, 1,0 ou 3,0 mg/kg foram administradas 30 minutos antes da administração de LPS ou de substância P. Os animais do grupo controle receberam Veículo (Tween 80 a 1% em salina estéril, 2 mL/kg, ip).

Nos experimentos de migração celular e febre, o LPS foi administrado nas doses de 0,3 e 30  $\mu$ g/kg, respectivamente, via ip. Os animais do grupo controle receberam salina estéril (2 mL/kg, ip). No experimento de extravasamento plasmático, substância P (30 pmol/50  $\mu$ L), LPS (200 ou 400  $\mu$ g/50  $\mu$ L) ou salina estéril (50  $\mu$ L) foram administrados via intradérmica.

Nos experimentos envolvendo a participação central da substância P, esta foi administrada via intracerebroventricular (icv) na concentração de 500 ng/2  $\mu$ L/rato, 30 min após o captopril (5  $\mu$ g/2  $\mu$ L/rato, icv). O SR140333 foi administrado nas concentrações de 0,3, 1,0 ou 3,0  $\mu$ g/2  $\mu$ L/rato, 30 minutos antes do captopril (60 min antes da substância P) ou dos estímulos pirogênicos (LPS 30  $\mu$ g/kg via ip ou IL-1 $\beta$  3,12 ng via icv). Os grupos controle receberam Veículo (Tween 80 a 0,1% em salina estéril, 2  $\mu$ L/rato, icv) e/ou salina estéril (2  $\mu$ L/rato, icv).

Essas administrações icv foram realizadas no ventrículo direito dos animais, através de uma agulha de injeção (30 G) que excedeu a cânula em 2,0 mm, acoplada a um tubo de polipropileno P20 que, por sua vez, estava conectado a uma micro-seringa Hamilton (capacidade de 25  $\mu$ L).

### 3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos experimentos de febre, os dados foram calculados como índice basal entre 30 e 120 min e índice de febre cumulativo entre 2 e 6 h (área sob curva), após a injeção dos estímulos pirogênicos. À exceção dos dados do experimento com a IL-1 $\beta$ , no qual foi utilizado para cálculo do índice de febre cumulativo o intervalo entre 1 e 6 h após a injeção, uma vez que a febre desta citocina inicia 1 hora após a sua administração. Todos os resultados obtidos foram expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e avaliados por análise de variância com um critério (ANOVA – *One way*). Quando encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), o teste para comparações múltiplas de Bonferroni foi aplicado. Utilizou-se, também, o teste-*t* de Student para amostras não pareadas, quando necessário. O nível de significância adotado foi de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o programa *GraphPad Prism, version 3.00 for Windows, San Diego California USA*.



## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DO SR140333 NA FEBRE INDUZIDA POR LPS

Lipopolissacarídeo (LPS) administrado na dose de 30,0  $\mu\text{g/kg}$ , via ip, promoveu um aumento significativo na temperatura corporal, a partir da segunda hora seguinte à sua administração, quando comparado o grupo controle que recebeu salina estéril via ip (2 mL/kg). Ambos os grupos receberam Veículo (2 mL/kg, ip) 30 min antes.

A administração do antagonista SR140333, nas doses de 0,3 ou 1,0 mg/kg via ip, 30 min antes da administração do LPS, não foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pelo LPS (figuras 1A e 1B, respectivamente). Já administração do SR140333 via ip na dose de 3,0 mg/kg reduziu a resposta febril em 77%. Entretanto, nesta dose o SR140333 promoveu uma redução significativa da temperatura corporal dos animais, 30 min após a sua administração e por, aproximadamente, duas horas (figura 1C).

A administração exclusiva do SR140333, via ip nas doses de 1,0 ou 3,0 mg/kg, não modificou a temperatura corporal basal dos animais (figura 1D).

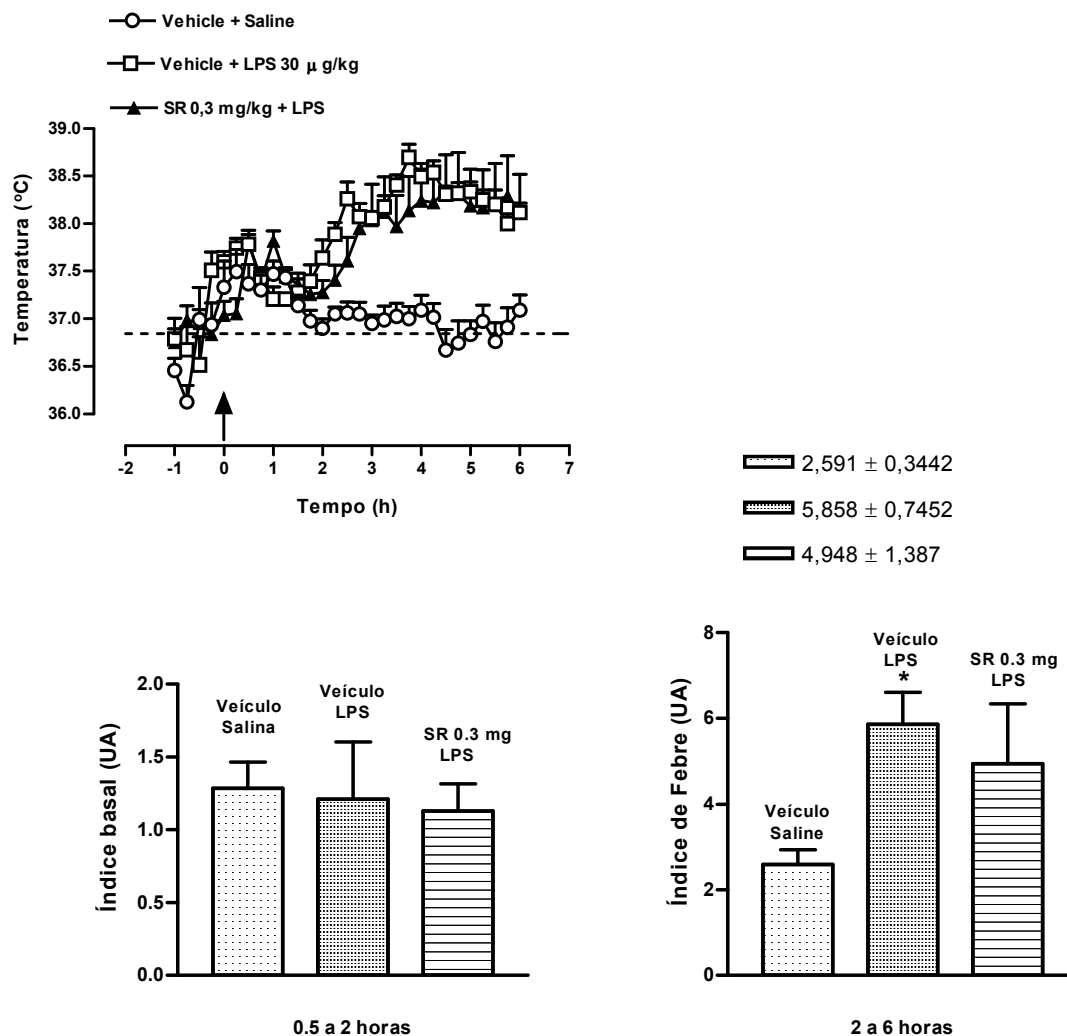


Figura 1A: Efeito da administração sistêmica do SR140333 na febre induzida por LPS em ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, na dose de 0,3 mg/kg, ou Veículo foram administrados via ip, 30 minutos antes da administração do LPS na dose de 30 $\mu$ g/kg, ou salina estéril, via ip. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da temperatura corporal em °C, registrada a cada 15 min, de 5 a 8 animais. As barras mostram a média  $\pm$  EPM da área sob curva (valores absolutos na legenda). \* diferença significativa em relação ao grupo Veículo + Salina,  $p < 0,01$ .

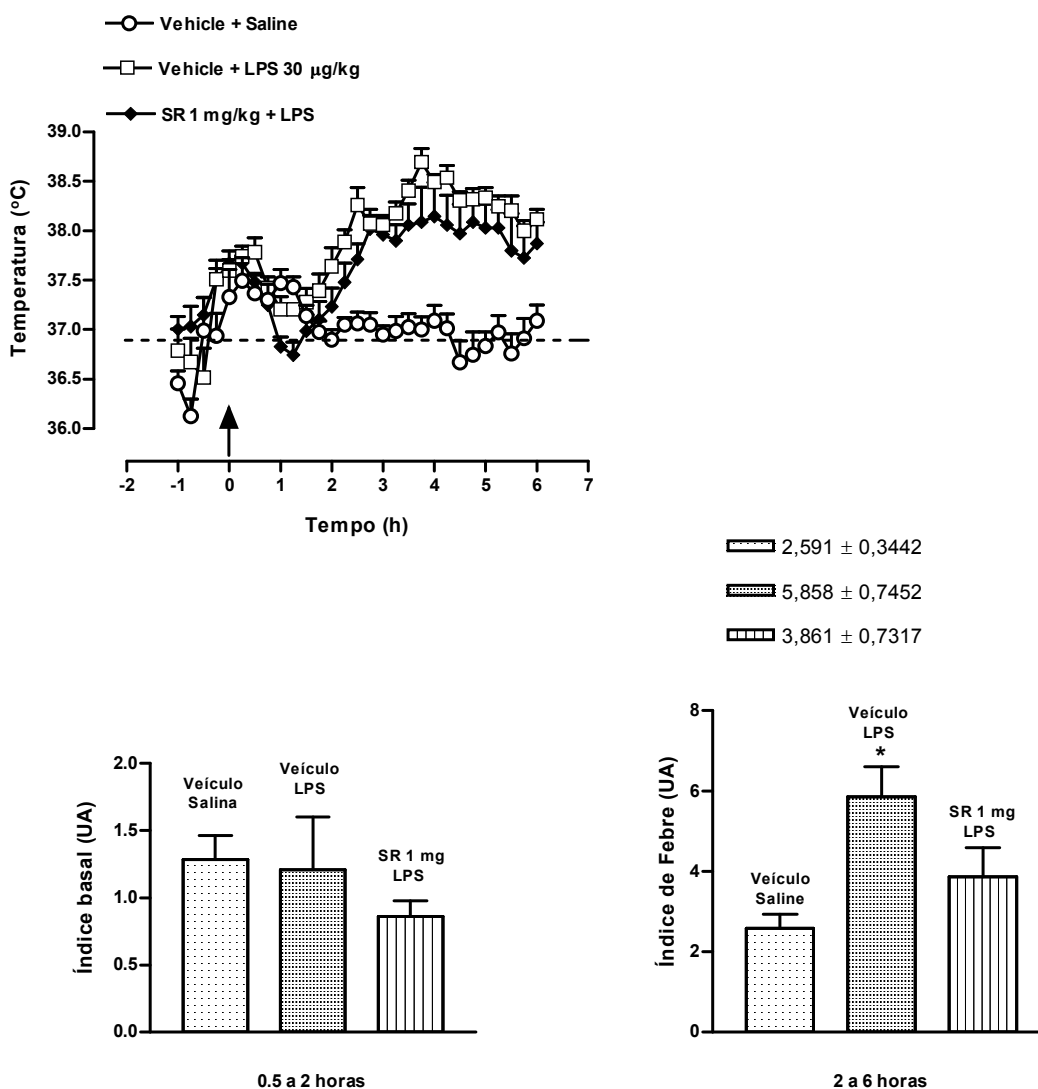


Figura 1B: Efeito da administração sistêmica do SR140333 na febre induzida por LPS em ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, na dose de 1,0 mg/kg, ou Veículo foram administrados via ip, 30 minutos antes da administração do LPS na dose de 30µg/kg, ou salina estéril, via ip. Os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal em °C, registrada a cada 15 min, de 5 a 8 animais. As barras mostram a média ± EPM da área sob curva (valores absolutos na legenda). \* diferença significativa em relação ao grupo Veículo + Salina,  $p < 0,01$ .

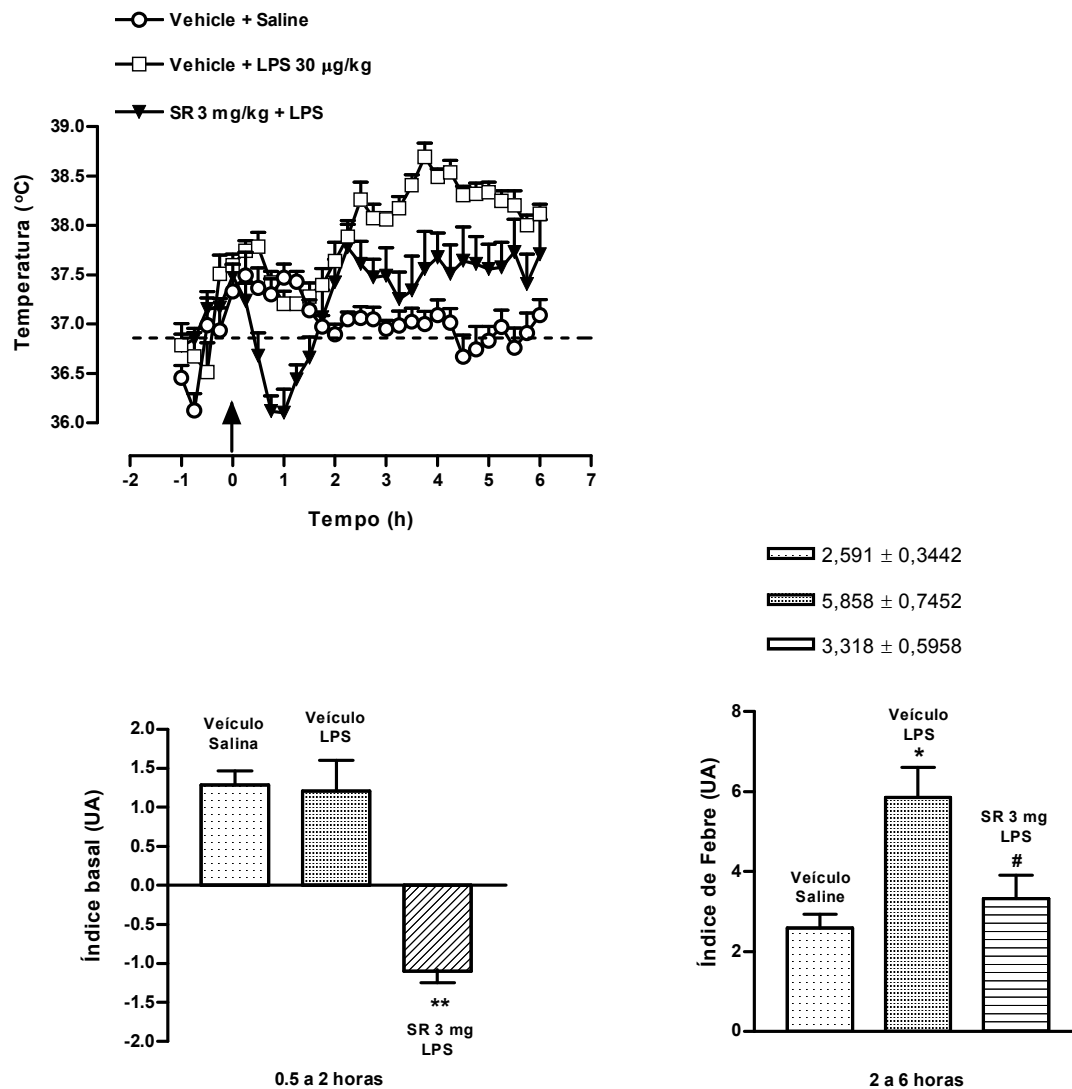


Figura 1C: Efeito da administração sistêmica do SR140333 na febre induzida por LPS em ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, na dose de 3,0 mg/kg, ou Veículo foram administrados via ip, 30 minutos antes da administração do LPS na dose de 30µg/kg, ou salina estéril, via ip. Os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal em °C, registrada a cada 15 min, de 5 a 8 animais. As barras mostram a média ± EPM da área sob curva (valores absolutos na legenda). \* diferença significativa em relação ao grupo Veículo + Salina,  $p < 0,01$ ; \*\* diferença significativa em relação ao grupo Veículo + Salina e Veículo + LPS,  $p < 0,001$ ; # diferença significativa em relação ao grupo Veículo + LPS,  $p < 0,05$ .

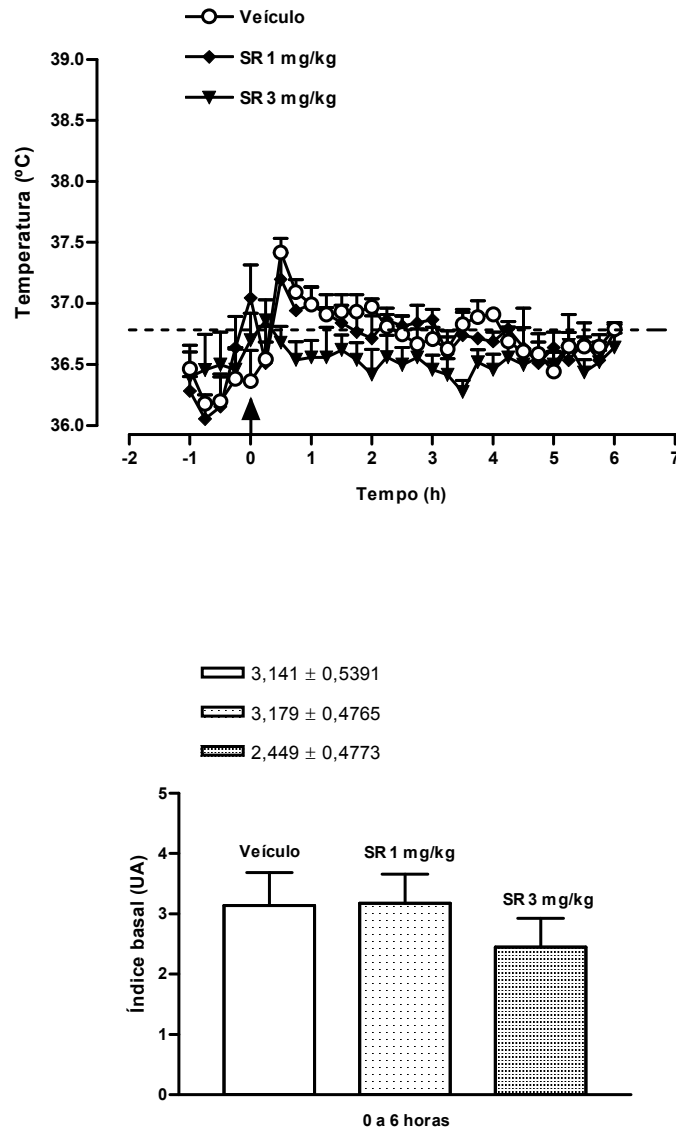


Figura 1D: Efeito da administração sistêmica do SR140333 na temperatura corporal basal de ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, nas doses de 1,0 ou 3,0 mg/kg, ou Veículo foram administrados via ip. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da temperatura corporal em °C, registrada a cada 15 min, de 4 a 5 animais. As barras mostram a média  $\pm$  EPM da área sob curva (valores absolutos na legenda).

#### 4.2. EFEITO DO SR140333 SOBRE O EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO POR SUBSTÂNCIA P OU LPS

A administração de substância P (SP) na concentração de 30 pmol ou LPS nas concentrações de 200 ou 400  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ /aplicação, via intradérmica (id), aumentou significativamente o extravasamento plasmático, expresso em  $\mu\text{g}$  de azul de Evans, em relação ao grupo controle que recebeu salina estéril (50  $\mu\text{L}$ /aplicação, id). Ambos os grupos receberam Veículo (2 mL/kg, ip) 30 min antes.

A administração do antagonista SR140333, na dose 1,0 mg/kg via ip, 30 min antes da administração de substância P (30 pmol/sítio, id), reduziu significativamente o extravasamento plasmático (81%), quando comparado ao grupo que recebeu Veículo + SP (figura 2A). Porém, a administração do SR140333 (1,0 mg/kg, ip), 30 min antes da aplicação do LPS, não foi capaz de modificar o extravasamento plasmático induzido por este (200 ou 400  $\mu\text{g}/\text{sítio}$ , id) (figura 2B).

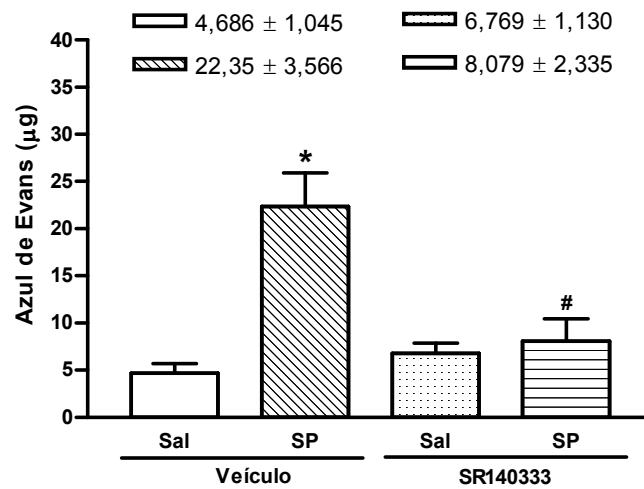


Figura 2A: Efeito do SR140333 no extravasamento plasmático induzido por substância P (SP) em ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, na dose 1,0 mg/kg, ou Veículo foram administrados via ip, 30 minutos antes da administração da SP (30 pmol/aplicação) ou salina estéril, via id. As barras representam a média  $\pm$  EPM da quantidade de azul de Evans extravasado em  $\mu$ g, de 6 animais (valores absolutos na legenda). \* diferença significativa em relação ao grupo Veículo + Sal,  $p < 0,001$ ; # diferença significativa em relação ao grupo Veículo + SP,  $p < 0,001$ .



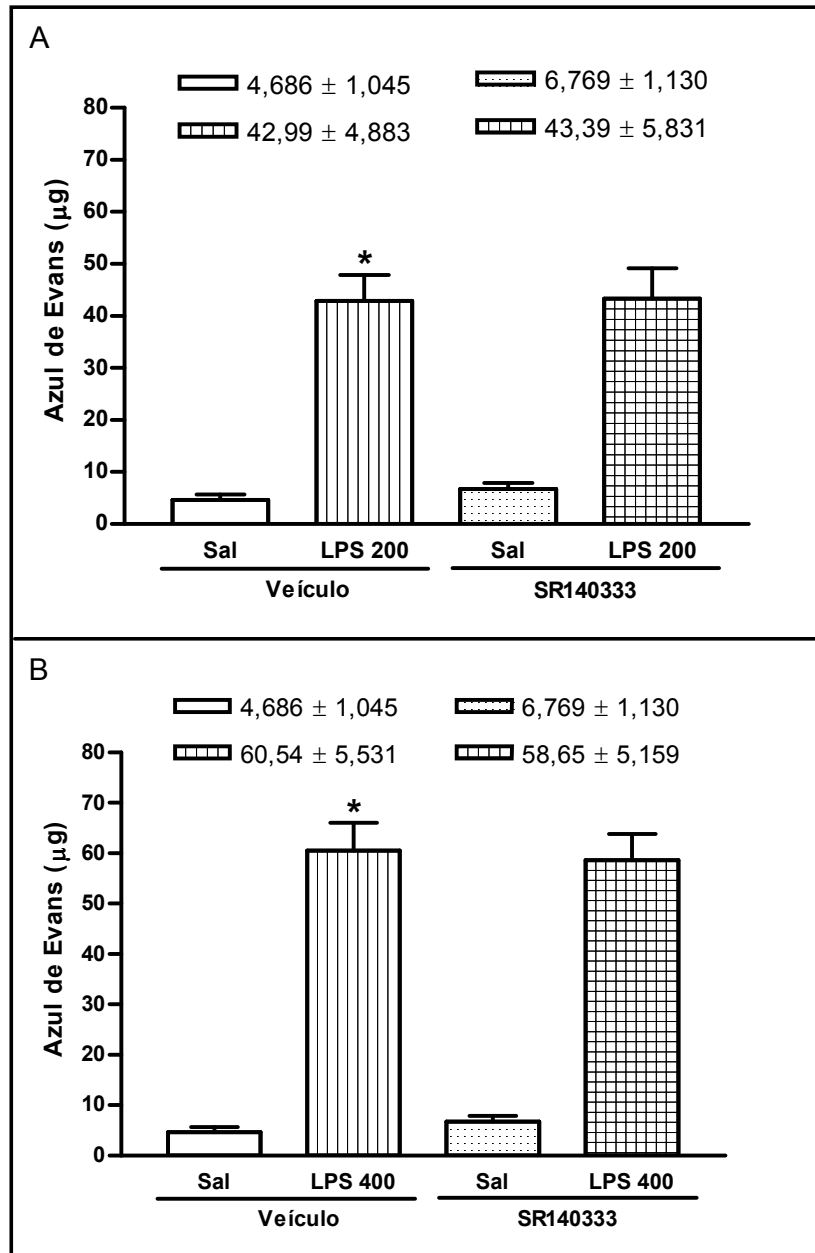


Figura 2B: Efeito do SR140333 no extravasamento plasmático induzido por LPS em ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, na dose 1,0 mg/kg, ou Veículo foram administrados via ip, 30 minutos antes da administração de LPS nas doses de 200 ou 400 µg/aplicação (painel **a** e **b**, respectivamente), ou salina estéril, via id. As barras representam a média ± EPM da quantidade de azul de Evans extravasado em µg, de 6 animais (valores absolutos nas legendas). \* diferença significativa em relação ao grupo Veículo + Sal,  $p < 0,001$ .

#### 4.3. MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR SUBSTÂNCIA P

Substância P administrada na dose de 10 nmol/kg via ip, não modificou a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, quando comparada ao grupo controle que recebeu salina estéril via ip (2 mL/kg). No entanto, a substância P administrada na dose de 30 nmol/kg aumentou de maneira significativa (mais de 100%) a migração de leucócitos totais, por aumentar significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, quatro horas após a sua administração (figura 3). Não houve diferença significativa entre os tratamentos no número de mononucleares ou eosinófilos (dados não mostrados).

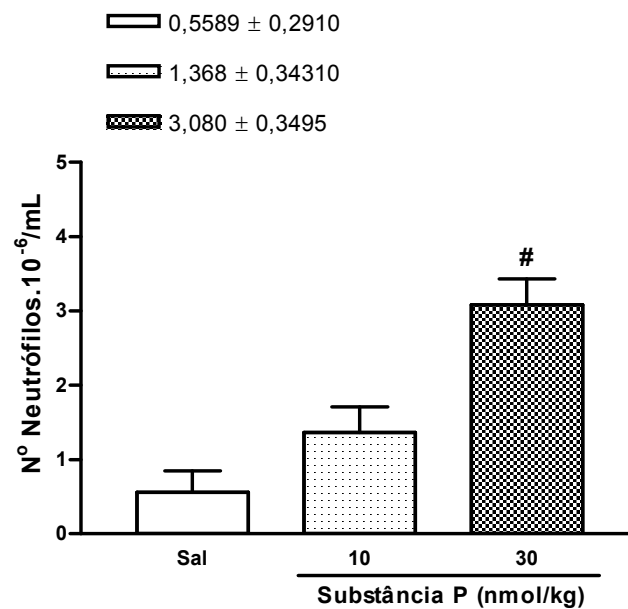


Figura 3: Migração de neutrófilos induzida por Substância P em ratos. Substância P nas doses de 10,0 ou 30,0 nmol/kg, ou salina estéril foram administrados, via ip, 4 horas antes da coleta do fluido peritoneal. As barras representam a média  $\pm$  EPM do número de neutrófilos por mL de fluido peritoneal, de 7 animais (valores absolutos na legenda). # diferença significativa em relação ao grupo Salina,  $p < 0,001$ , e ao grupo substância P 10 nmol/kg,  $p < 0,01$ .

#### 4.4. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CONCOMITANTE DE LPS E SUBSTÂNCIA P NA MIGRAÇÃO CELULAR

A administração de substância P na dose de 10 nmol/kg ou de LPS na dose de 0,2 µg/kg, via ip, não modificou a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (CP), quando comparados ao grupo controle que recebeu salina estéril via ip (2 mL/kg).

No entanto, os animais que receberam LPS (0,2 µg/kg, ip), 30 minutos antes da administração de Substância P (10 nmol/kg, ip), tiveram um aumento significativo no número de leucócitos totais, decorrente do aumento da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (63%), quatro horas após a administração do LPS (figura 4). Não houve diferença significativa entre os grupos no número de mononucleares ou eosinófilos na CP (dados não mostrados).

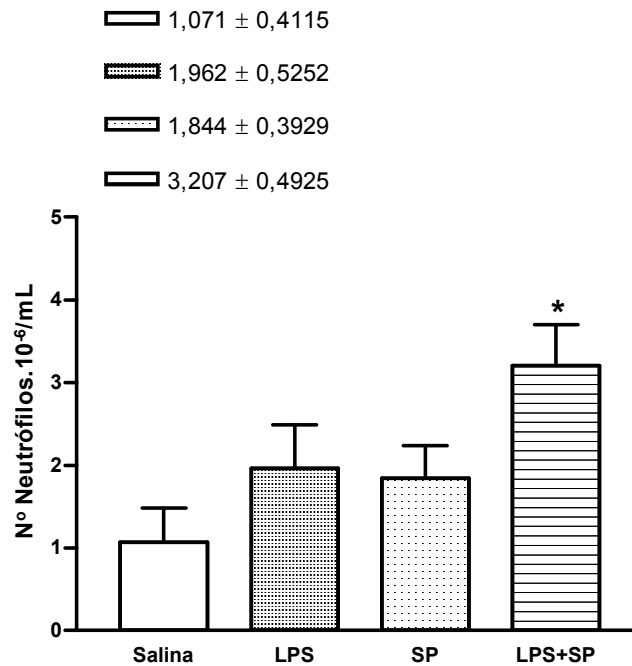


Figura 4: Efeito da administração concomitante de LPS e Substância P na migração de neutrófilos em ratos. LPS na dose de  $0,2 \mu\text{g/kg}$ , Substância P (SP) na dose de  $10 \text{ nmol/kg}$ , ambos ou salina estéril, foram administrados, via ip, 4 horas antes da coleta do fluido peritonial. As barras representam a média  $\pm$  EPM do número de neutrófilos por mL de fluido peritonial, de 5 a 6 animais (valores absolutos na legenda). \* diferença significativa em relação ao grupo Salina,  $p < 0,01$ .

#### 4.5. EFEITO DO SR140333 SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS RESIDENTES NA CAVIDADE PERITONIAL

A administração do antagonista SR140333 na dose de 1 mg/kg, via ip, não modificou o número de células mononucleares, neutrófilos, eosinófilos ou basófilos residentes na cavidade peritoneal, avaliadas quatro horas após a administração, quando comparado ao grupo controle que recebeu Veículo (2 mL/kg, ip) (figura 5).

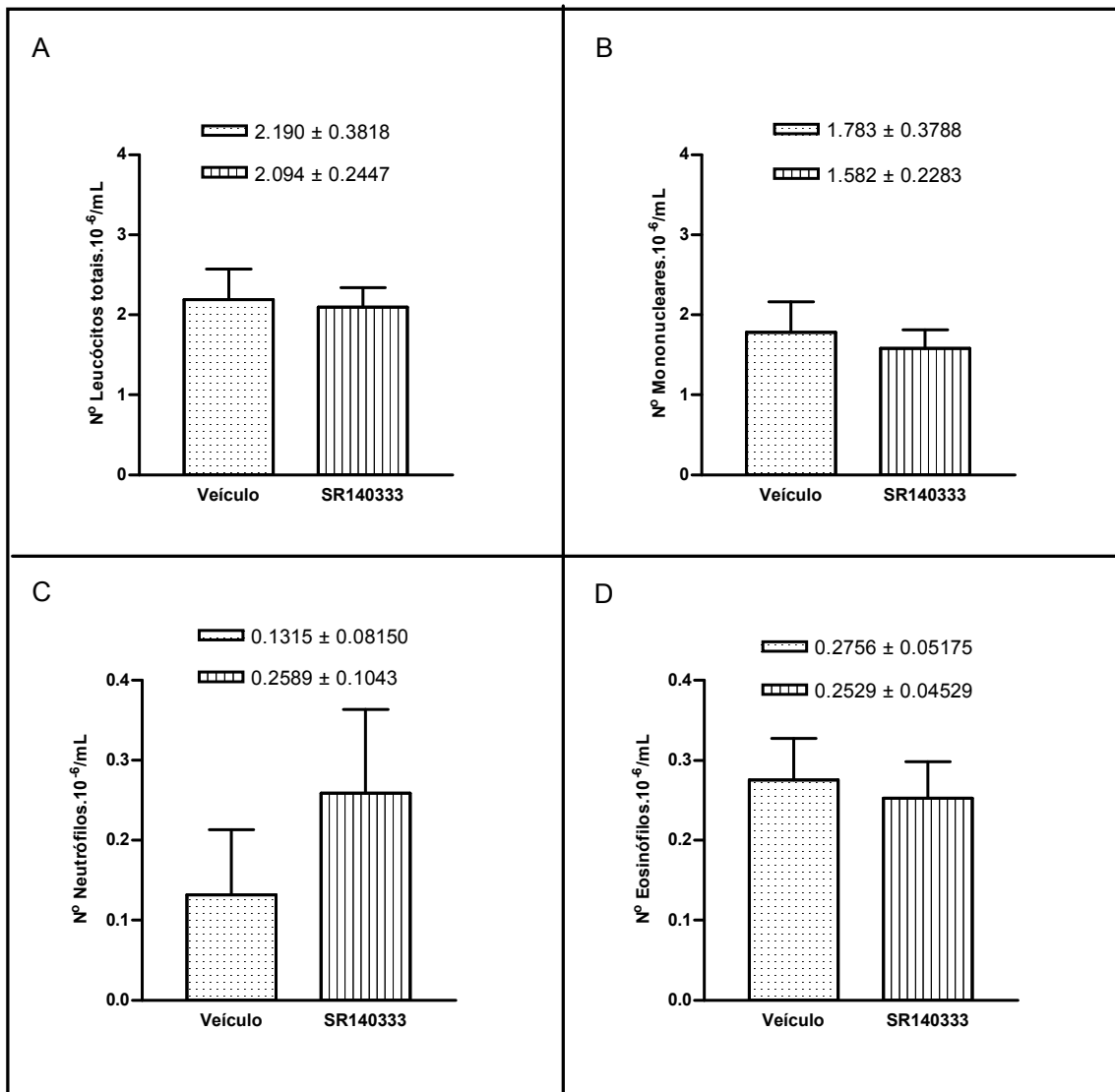


Figura 5: Efeito do SR140333 sobre o número de células residentes na cavidade peritoneal de ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, na dose de 1,0 mg/kg, ou Veículo foram administrados por via ip, 4 horas antes da coleta do fluido peritoneal. As barras representam a média  $\pm$  EPM do número de leucócitos (A), mononucleares (B), neutrófilos (C) ou eosinófilos (D), por mL de fluido peritoneal, de 8 a 10 animais (valores absolutos nas legendas).

#### 4.6. MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR LPS

LPS nas doses de 0,3, 1,0 ou 3,0  $\mu\text{g/kg}$ , administrado pela via ip, aumentou significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, quando comparado ao grupo controle que recebeu salina estéril via ip (2 mL/kg), quatro horas após a administração (figura 6). Não houve diferença significativa entre os grupos no número de mononucleares ou eosinófilos (dados não mostrados).



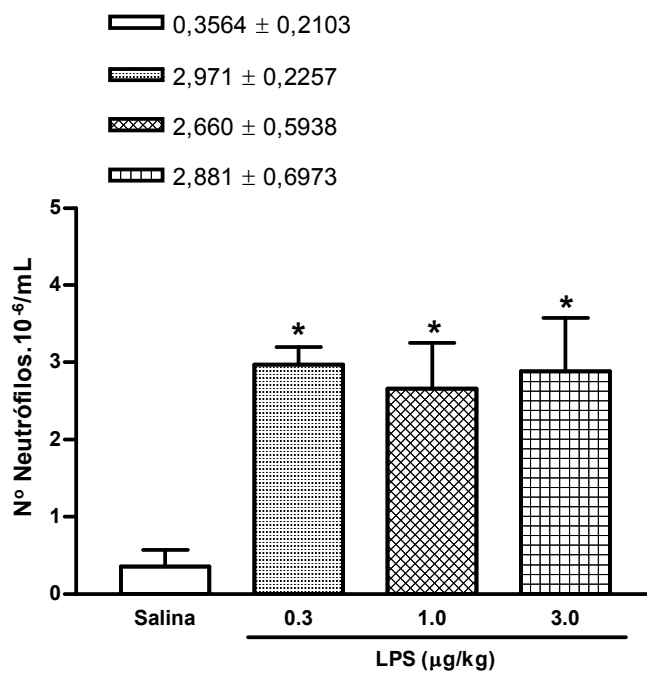


Figura 6: Migração de neutrófilos induzida por LPS em ratos. LPS nas doses de 0,3, 1,0 ou 3,0 µg/kg, ou salina estéril, foram administrados, via ip, 4 horas antes da coleta do fluido peritonial. As barras representam a média ± EPM do número neutrófilos por mL de fluido peritonial, de 7 a 11 animais (valores absolutos na legenda). \* diferença significativa em relação ao grupo Salina,  $p < 0,05$ .

#### 4.7. EFEITO DO SR140333 NA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR LPS

LPS administrado na dose de 0,3 µg/kg, via ip, aumentou significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, quando comparado ao grupo controle que recebeu salina estéril via ip (2 mL/kg). Ambos os grupos receberam Veículo (2 mL/kg, ip) 30 min antes.

A administração do antagonista SR140333, nas doses de 0,3 ou 1,0 mg/kg via ip, 30 min antes da administração do LPS, não modificou a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, induzida pelo LPS (figura 7). Também não houve diferença significativa entre os grupos, no número de mononucleares ou eosinófilos (dados não mostrados).

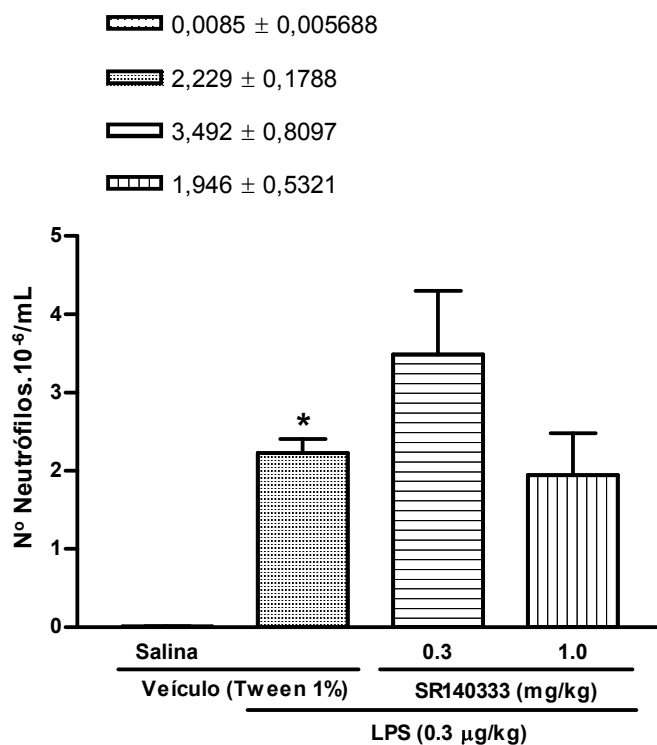


Figura 7: Efeito do SR140333 na migração de neutrófilos induzida por LPS em ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, foi administrado nas doses de 0,3 ou 1,0 mg/kg, via ip, 30 minutos antes da administração do LPS na dose de 0,3 µg/kg, ou salina estéril, via ip. As barras representam a média ± EPM do número de neutrófilos por mL de fluido peritoneal, de 4 a 5 animais (valores absolutos na legenda). \* diferença significativa em relação ao grupo Veículo + Salina,  $p < 0,05$ .

#### 4.8. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DO SR140333 NA FEBRE INDUZIDA POR LPS

Lipopolissacarídeo (LPS) administrado na dose de 30,0  $\mu\text{g/kg}$ , via ip, promoveu um aumento significativo da temperatura corporal, a partir da segunda hora seguinte à sua administração, quando comparado o grupo controle, que recebeu salina estéril via ip (2 mL/kg). Ambos os grupos receberam Veículo (2  $\mu\text{L/rato}$ ) via intracerebroventricular (icv), 30 min antes.

A administração do antagonista SR140333, na concentração de 0,3 $\mu\text{g}/2\mu\text{L}$  via icv, 30 min antes da administração do LPS, não foi capaz de reduzir a resposta febril induzida pelo mesmo (figura 8A). Já a administração do SR140333 nas concentrações de 1,0 ou 3,0  $\mu\text{g}/2\mu\text{L}$ , via icv, reduziu em 49% e 85%, respectivamente, a febre induzida pelo LPS (figuras 8B e 8C).

A administração exclusiva do SR140333 na concentração de 3,0  $\mu\text{g}/2\mu\text{L}$ , via icv, não modificou a temperatura corporal basal dos animais (figura 8D).

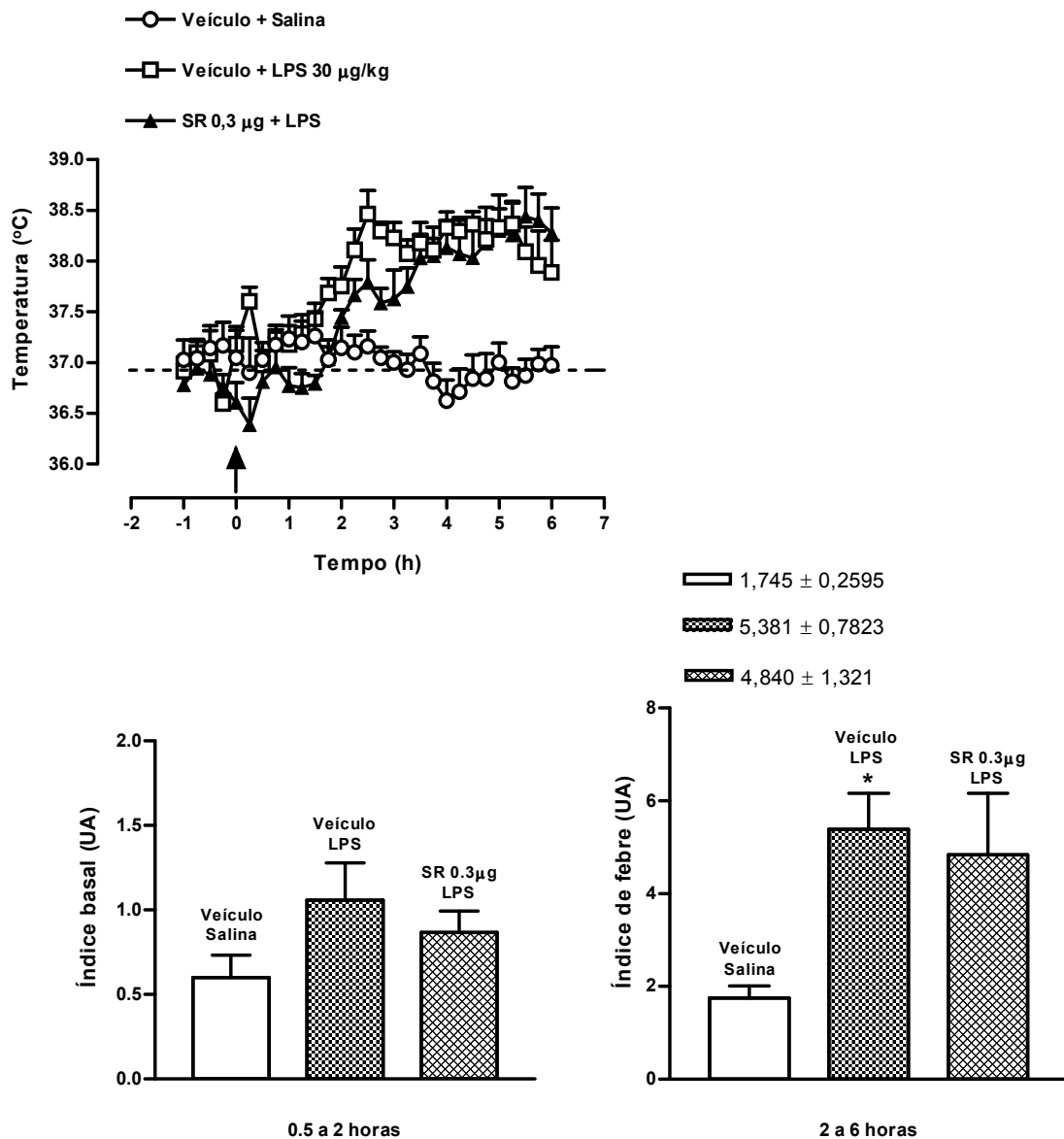


Figura 8A: Efeito da administração central do SR140333 na febre induzida por LPS em ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, na dose de 0,3 µg/rato, ou Veículo foram administrados via icv, 30 minutos antes da administração do LPS na dose de 30µg/kg, ou salina estéril, via ip. Os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal em °C, registrada a cada 15 min, de 5 a 7 animais. As barras mostram a média ± EPM da área sob curva (valores absolutos na legenda). \* diferença significativa em relação ao grupo Veículo + Salina,  $p < 0,01$ .

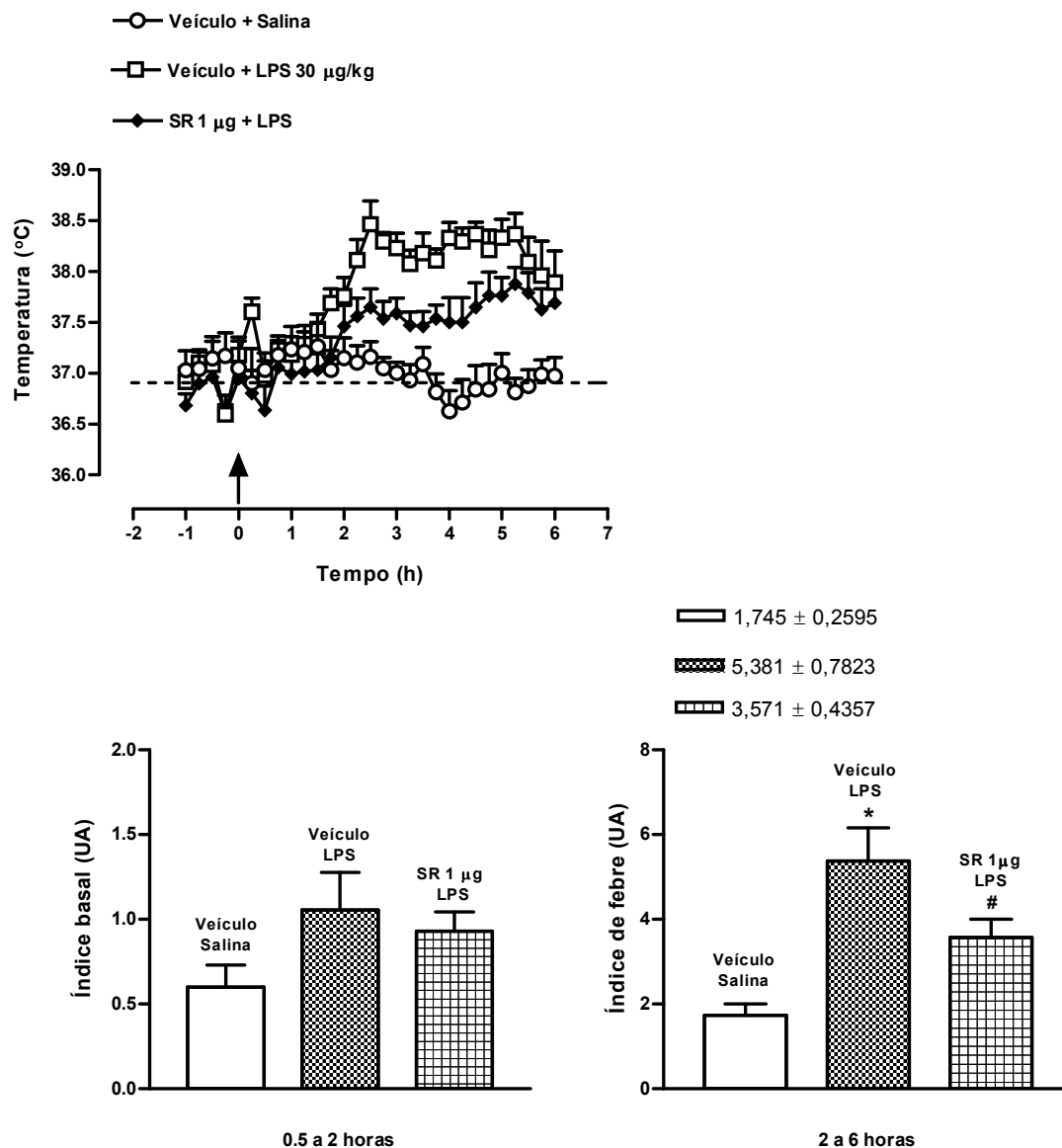


Figura 8B: Efeito da administração central do SR140333 na febre induzida por LPS em ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, na dose de 1,0 µg/rato, ou Veículo foram administrados via icv, 30 minutos antes da administração do LPS na dose de 30µg/kg, ou salina estéril, via ip. Os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal em °C, registrada a cada 15 min, de 6 a 8 animais. As barras mostram a média ± EPM da área sob curva (valores absolutos na legenda). \* diferença significativa em relação ao grupo Veículo + Salina,  $p < 0,001$ ; # diferença significativa em relação ao grupo Veículo + LPS,  $p < 0,05$ .

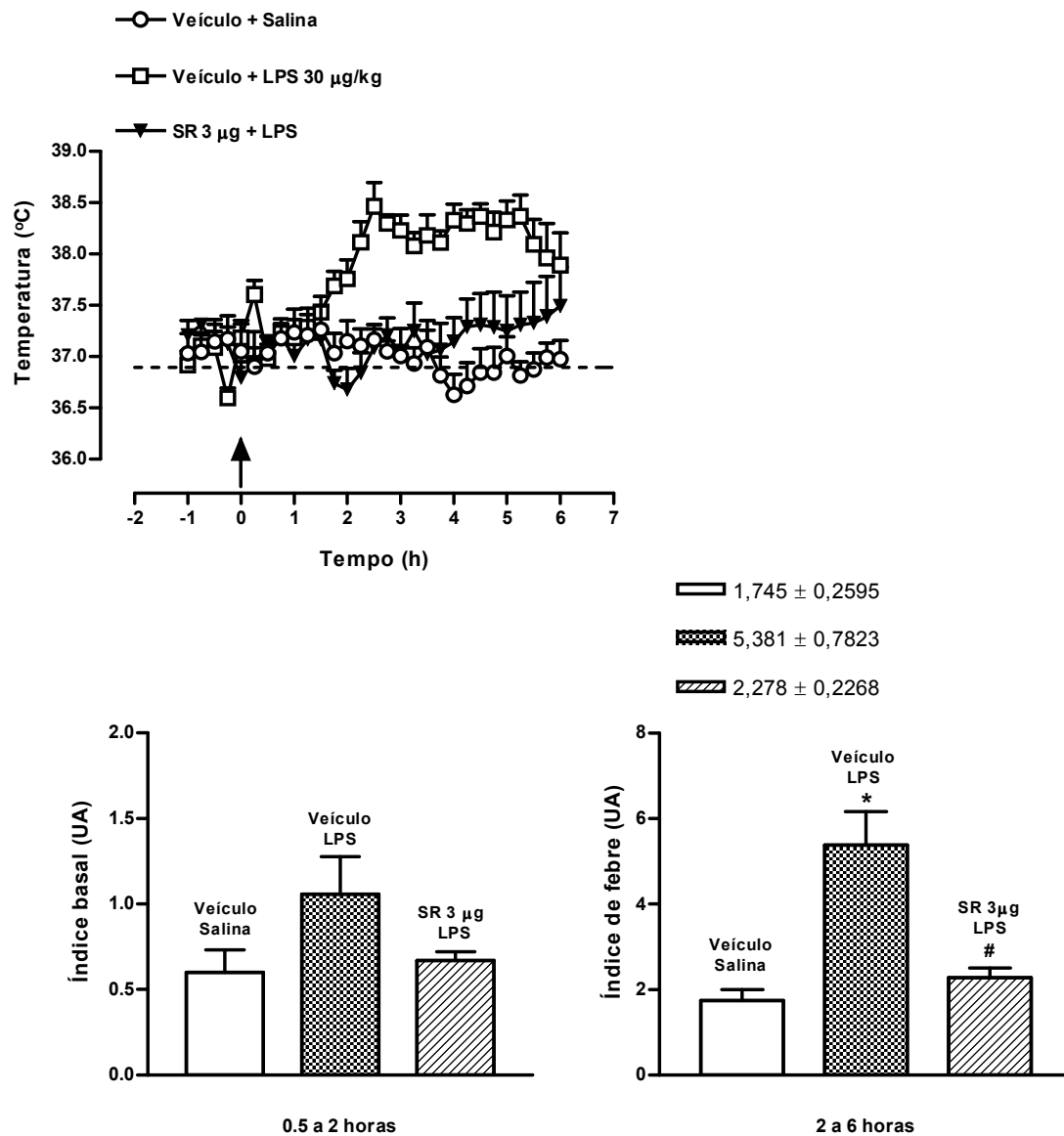


Figura 8C: Efeito da administração central do SR140333 na febre induzida por LPS em ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, na dose de 3,0 µg/rato, ou Veículo foram administrados via icv, 30 minutos antes da administração do LPS na dose de 30µg/kg, ou salina estéril, via ip. Os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal em °C, registrada a cada 15 min, de 5 a 7 animais. As barras mostram a média ± EPM da área sob curva (valores absolutos na legenda). \* diferença significativa em relação ao grupo Veículo + Salina,  $p < 0,001$ ; # diferença significativa em relação ao grupo Veículo + LPS,  $p < 0,01$ .

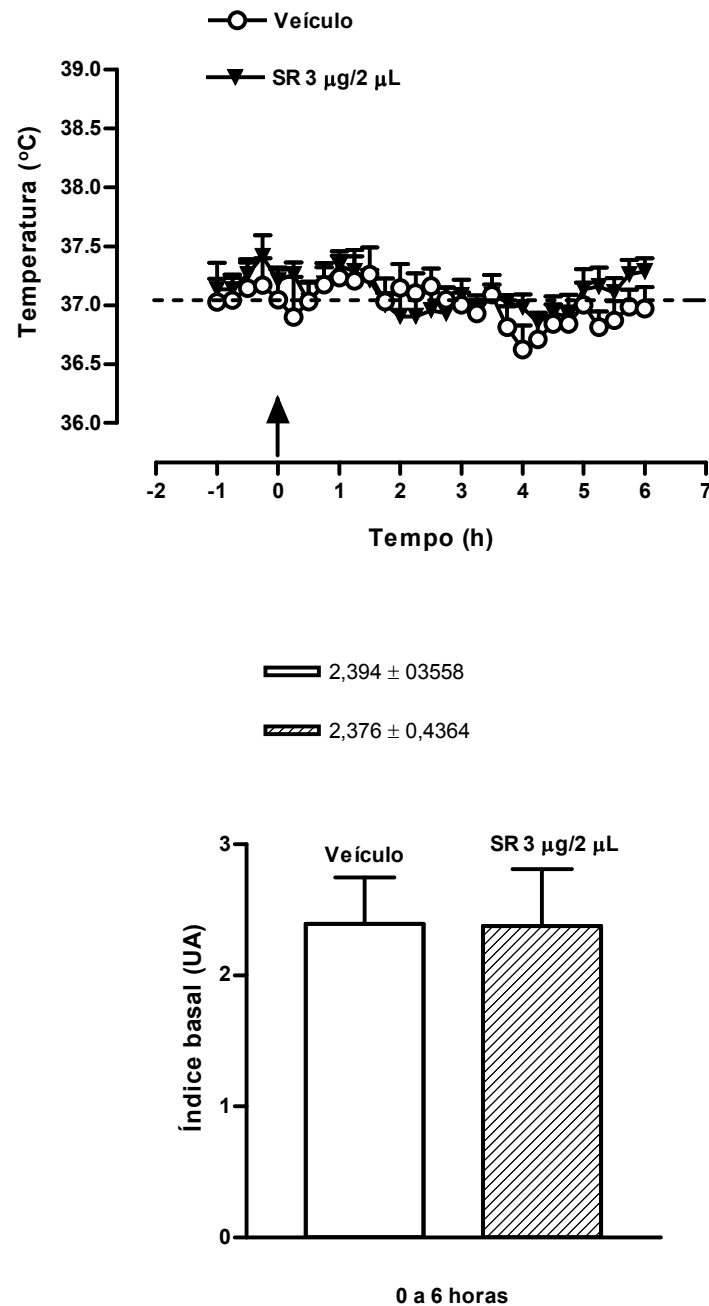


Figura 8D: Efeito do SR140333 na temperatura corporal basal de ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, na dose de 3,0 µg/sítio, ou Veículo foram administrados via icv. Os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal em °C, registrada a cada 15 min. As barras mostram a média ± EPM da área sob curva, de 4 a 8 animais (valores absolutos na legenda).



#### 4.9. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DO SR140333 NO AUMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL INDUZIDO POR SUBSTÂNCIA P

Substância P administrada pela via icv na concentração de 500 ng/2 $\mu$ L, 30 min após a administração de captopril (5  $\mu$ g/2  $\mu$ L, icv) promoveu um aumento significativo da temperatura corporal, quando comparada ao grupo controle, que recebeu salina estéril (2 $\mu$ L/rato, icv). Ambos os grupos receberam Veículo (2  $\mu$ L/rato, icv) 30 min antes do captopril.

A administração do antagonista SR140333, na concentração de 3 $\mu$ g/2 $\mu$ L, via icv, 30 min antes da administração do captopril, ou seja, 60 min antes da administração da substância P, reduziu significativamente (89%) o aumento da temperatura corporal induzido por este neuropeptídeo (figura 9).

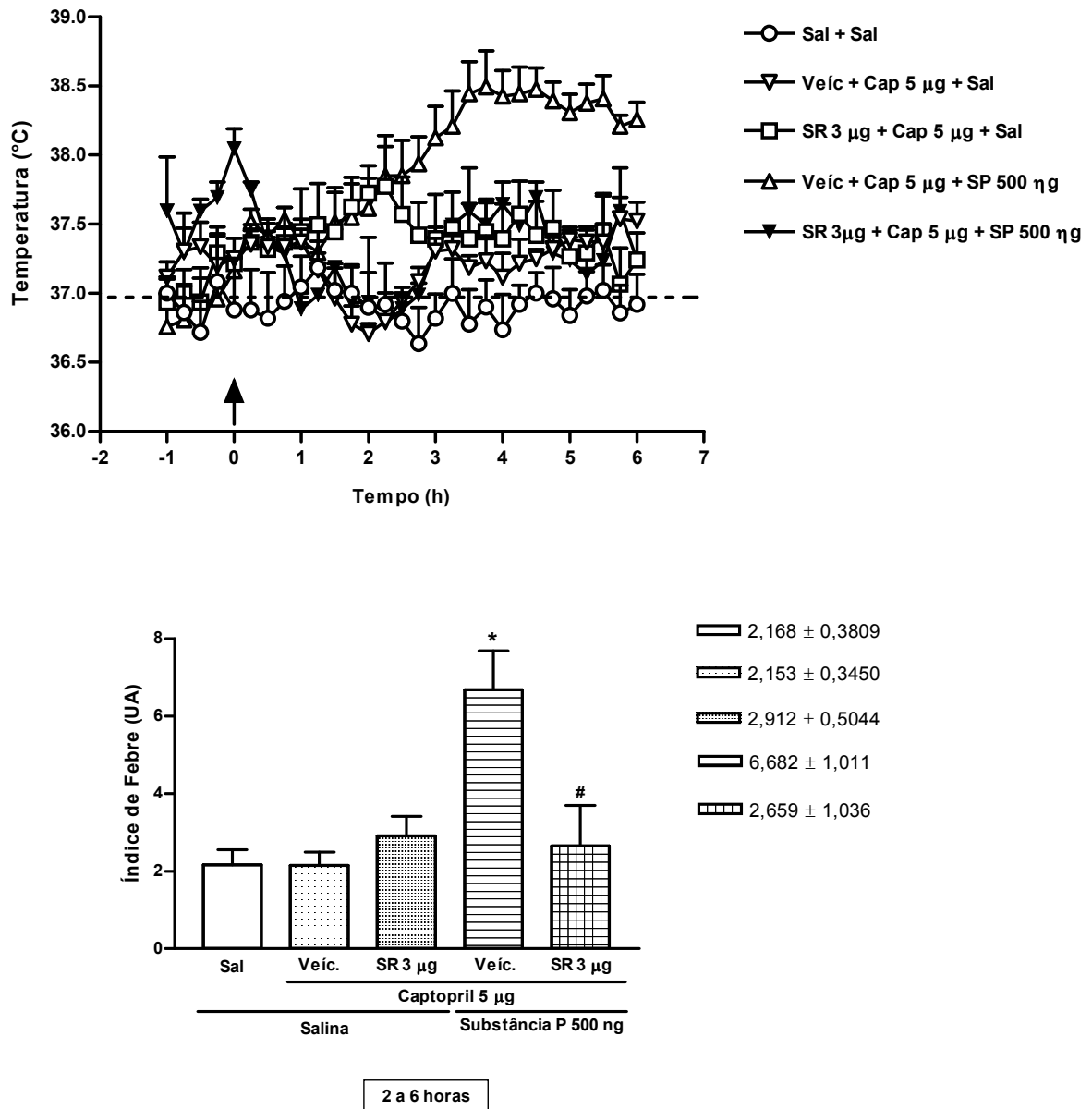


Figura 9: Efeito da administração central do SR140333 no aumento da temperatura corporal induzido por substância P em ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, na dose de 3,0 µg/rato, ou Veículo foram administrados via icv, 30 minutos antes da administração de captopril (5 µg/rato) ou salina estéril via icv. Trinta minutos após a administração de captopril ou salina, os animais receberam substância P (500 ng/rato) ou salina estéril, via icv. Os pontos representam a média ± EPM da temperatura corporal em °C, registrada a cada 15 min, de 2 a 6 animais. As barras mostram a média ± EPM da área sob curva (valores absolutos na legenda). \* diferença significativa em relação ao grupo Veículo+ Captopril + Salina,  $p < 0,001$ ; # diferença significativa em relação ao grupo Veículo+ Captopril + Substância P,  $p < 0,001$ .

#### 4.10. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DO SR140333 NA FEBRE INDUZIDA POR IL-1 $\beta$

Interleucina (IL)-1 $\beta$  administrada pela via icv na concentração de 3,12 $\eta$ g/2 $\mu$ L, promoveu um aumento significativo da temperatura corporal, quando comparada ao grupo controle, que recebeu salina estéril, via icv (2 $\mu$ L/rato). Ambos os grupos receberam Veículo (2 $\mu$ L/rato) via icv, 30 min antes.

A administração do antagonista SR140333, na concentração de 3 $\mu$ g/2 $\mu$ L, via icv, 30 min antes da administração da IL-1 $\beta$ , não foi capaz de reduzir a resposta febril induzida por esta citocina (figura 10).

Neste resultado, os dados foram calculados como índice de febre cumulativo (área sob a curva) entre 1 e 6 h, após a injeção dos estímulos pirogênicos, porque a febre desta citocina inicia em 1 h, diferente da febre do LPS que inicia em 2 horas.

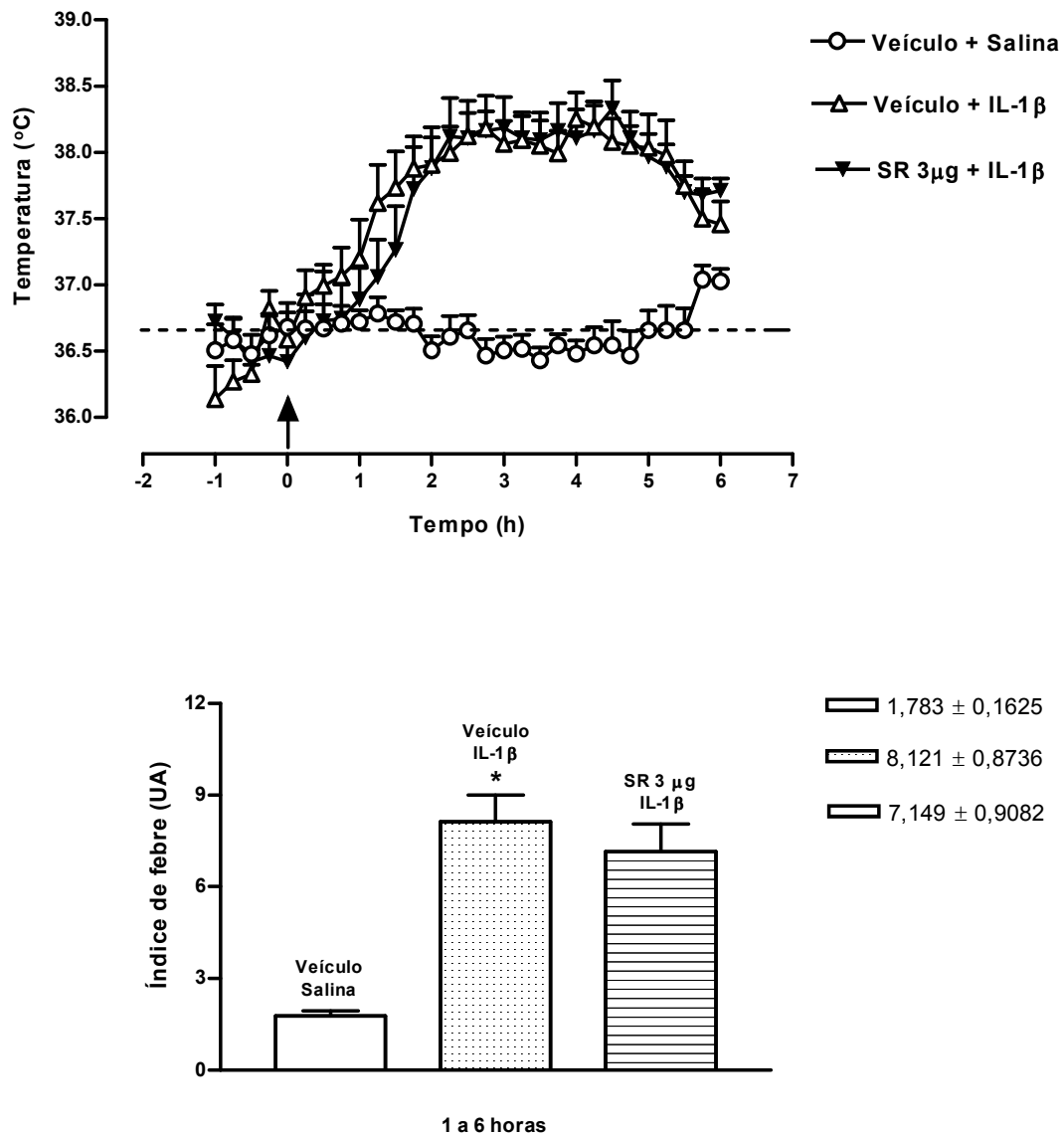


Figura 10: Efeito da administração central do SR140333 na febre induzida por IL-1 $\beta$  em ratos. O antagonista de receptor NK1, SR140333, na dose de 3,0  $\mu$ g/sítio, ou Veículo foram administrados via icv, 30 minutos antes da administração da IL-1 $\beta$  (3,12 ng/rato) ou salina estéril, via icv. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da temperatura corporal em °C, registrada a cada 15 min, de 7 a 9 animais. As barras mostram a média  $\pm$  EPM da área sob curva (valores absolutos na legenda). \* diferença significativa em relação ao grupo Veículo + Salina,  $p < 0,001$ .

## **5. DISCUSSÃO**

Neste estudo, demonstramos que a substância P não é um importante mediador das respostas periféricas ao LPS (febre, migração celular e extravasamento plasmático), através da ativação de receptores NK1. Em adição, demonstramos que, embora a substância P liberada no SNC participe da resposta febril induzida por LPS através da ativação de receptores NK1, estes receptores não estão envolvidos na resposta febril induzida por IL-1 $\beta$ . Além disso, o SR140333, um novo antagonista de receptores NK1 em fase de estudos pré-clínicos, mostrou não exercer ações centrais quando administrado periféricamente, o que poderá fazer desta droga um importante instrumento em respostas onde a liberação periférica da substância P seja importante, como na colite ulcerativa.

O LPS é, provavelmente, a endotoxina bacteriana conhecida de maior potência inflamatória. Em humanos e animais, o LPS causa diversos efeitos fisiopatológicos como febre, choque e a indução da resposta de fase aguda (GALLIN et al., 1992). A injeção sistêmica de LPS, em animais experimentais, ativa o sistema imunológico levando à liberação de citocinas pró-inflamatórias endógenas, como a interleucina (IL)-1 $\beta$ , a IL-6 e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (ELMQUIST et al., 1997; KLUGER, 1991; ROTHWELL, 1997). Uma vez liberados, essas proteínas enviam sinais à área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO/HA) (especialmente à área pré-óptica ventromedial), que é o centro responsável pela regulação da temperatura corporal (ELMQUIST et al., 1996), promovendo, assim, a febre. É bastante aceito que estes sinais alcançam a APO/HA através da corrente sanguínea. No entanto, diversos estudos utilizando a vagotomia subdiafragmática têm demonstrado que a transmissão via nervo vago, principalmente via fibras aferentes vagais hepáticas, são importantes para o desencadeamento da febre pelo LPS e outras citocinas (KOULCHITSKY, 2000; TUREK et al., 2005; WERNER et al., 2003; SIMONS et al., 1998).

Diversos estudos também têm evidenciado a capacidade da substância P modular as células do sistema imune, induzindo a síntese por estas células de várias citocinas, como a IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$  e a IL-6 (LEE et al., 1994; YARAEI et al., 2003; DELGADO et al., 2003). Desta maneira, nossa hipótese inicial foi a de que a substância P poderia ser liberada das fibras aferentes vagais após a estimulação com LPS e, assim, contribuir para a liberação de citocinas, favorecendo então a resposta febril. Esta sinalização, portanto, estaria ausente após a vagotomia subdiafragmática.

Em nossos experimentos, a administração intraperitoneal de LPS (30 µg/kg), aumentou significativamente a temperatura corporal dos animais. No entanto, a administração intraperitoneal do antagonista seletivo de receptor para neurocininas NK1, SR140333, nas doses de 0,3 ou 1,0 mg/kg, não modificou esta resposta febril desencadeada pelo LPS (figuras 1A e 1B).

Alguns estudos anteriores mostram a participação da substância P na resposta febril desencadeada pelo LPS. BALASKÓ et al., em 2000, observaram que a administração do antagonista NK1 CP-96,345, uma hora antes da administração intravenosa do LPS, reduziu significativamente a febre induzida por esta endotoxina. Resultados semelhantes foram obtidos por BLATTEIS et al. (1994) e SZELÉNYI et al. (1997), com a administração de antagonistas peptídicos da mesma. No entanto, é possível que a diferença observada entre os nossos resultados e os obtidos por esses autores mencionados acima resida no fato de que os mesmos administraram os antagonistas NK1 centralmente (diretamente na área pré-óptica ou intracerebroventricular). Isto sugere que a substância P liberada no sistema nervoso central (SNC) tem um papel mais importante na resposta febril desencadeada pelo LPS do que a liberação periférica deste neuropeptídeo. Soma-se a isto o fato do SR140333 ter baixo poder de penetração no SNC (JUNG et al., 1994), justificando, assim, sua inefetividade quando administrado periféricamente em nossos experimentos.

Em uma dose superior do antagonista (3 mg/kg), observamos uma redução significativa do pico da resposta febril induzida pelo LPS. Entretanto, esta redução foi precedida por uma hipotermia inicial, o que sugere que ela resulte de uma alteração nos mecanismos termorregulatórios dos animais (figura 1C). No entanto, quando o SR140333 foi administrado sozinho, nas doses de 1 ou 3 mg/kg ip, o mesmo não modificou significativamente a temperatura basal dos animais (figura 1D). Ou seja, o antagonista na dose de 3 mg/kg ip é capaz de induzir hipotermia somente na presença do LPS.

Estudos mostram que o LPS é capaz de induzir hipotermia em roedores, principalmente quando administrado em altas doses (500 µg/kg, por exemplo) e em temperaturas menores do que 30°C (DeRIJK et al., 1994; ROMANOVSKI e SZÉKELY, 1998; STEINER et al., 2009); no entanto, mesmo utilizando-se doses baixas de LPS (5 µg/kg, por exemplo) este efeito ainda pode ser observado (HARE

et al., 1995; MARTIN et al., 1995; LEDEBOER et al., 2002; ZHANG et al., 2003). O desenvolvimento da hipotermia depende do tipo de LPS utilizado, sendo o LPS que nós utilizamos mais efetivo do que outros no desencadeamento desta resposta (DOGAN et al., 2000; AKARSU e MAMUK, 2007); e pode ser mediado por diversas substâncias como a vasopressina (SAIA e CARNIO, 2006), o TNF- $\alpha$  (DeRIJK e BERKENBOSCH, 1994; AKARSU e MAMUK, 2007), os leucotrienos (PAUL et al., 1999), dentre outras.

Em nossos experimentos, a administração de LPS 30  $\mu$ g/kg ip numa temperatura ambiente de  $22 \pm 2$  °C não causou hipotermia nos animais. Desta forma, é provável que a hipotermia observada nos animais seja decorrente de um efeito sinérgico entre o SR140333 e o LPS quando administrados periféricamente, como exemplo por inibir os mecanismos termorregulatórios que envolvem a substância P (SHIBATA et al., 1988; BLATTEIS et al., 1994; SZELÉNYI et al., 1997; BALASKÓ et al., 2000) e/ou por interferir com a liberação/atividade das substâncias liberadas pelo LPS durante a hipotermia, o que, possivelmente, facilitaria o desenvolvimento da hipotermia. De qualquer forma, nosso experimento exclui a possibilidade de utilizar o SR140333 na dose de 3 mg/kg.

A fim de confirmar que a dose de 1mg/kg já seria suficiente para exercer algum efeito periférico, realizamos um experimento de permeabilidade vascular. A aplicação intradérmica de substância P (30 pmol) ou LPS (200 ou 400  $\mu$ g), aumentou significativamente o extravasamento plasmático, avaliado através do extravasamento de azul de Evans para a pele, quando comparado ao grupo controle que recebeu salina. A administração do SR140333, na dose de 1 mg/kg via ip, reduziu significativamente (63%) o extravasamento plasmático induzido pela substância P, mas não foi capaz de modificar o extravasamento plasmático induzido por LPS (figuras 2A e 2B, respectivamente).

O aumento da permeabilidade vascular é um evento inicial da resposta inflamatória. Diferentes receptores têm se mostrado capazes de modular, direta ou indiretamente, a permeabilidade vascular, como os receptores H<sub>1</sub> de histamina (GOEZY e KATO, 1963; BHARGAVA et al., 1977), os receptores de serotonina 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub> (SARIA et al., 1983), os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de bradicinina (BERTRAND et al., 1993; UENO et al., 1995), os receptores de taquicininas NK1 (JACQUES et al., 1989; BERTRAND et al., 1993b), entre outros.



Existem trabalhos mostrando que a substância P é capaz de promover um aumento na permeabilidade vascular através da liberação de vários mediadores como a histamina (para revisão ver MAGGI, 1997; e HARRISON e GEPPETTI, 2001), a bradicinina (SULPIZIO et al., 2004), ou diretamente causando abertura das junções entre as células endoteliais (BOWDEN et al., 1994); efeitos mediados pelos receptores NK1. PASSOS et al. (2004) também mostraram que os receptores NK1 são importantes para o desenvolvimento de edema induzido por bradicinina. Portanto, nossos resultados estão de acordo com os dados mencionados acima e ressaltam a importância dos receptores NK1 para as ações da substância P e a efetividade do tratamento com SR140333.

O LPS também aumenta a permeabilidade vascular através da liberação de histamina (HIRASAWA et al., 2006; WU et al., 2004), de leucotrieno B<sub>4</sub> (para revisão ver WAGNER e ROTH, 2000), do aumento da expressão dos receptores B<sub>1</sub> de bradicinina (PASSOS et al., 2004) e de receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II (ZHANG e SUN, 2005), entre outros. O fato do SR140333 não ter reduzido o extravasamento plasmático induzido por LPS, provavelmente, deve-se ao fato da substância P não participar diretamente desta resposta induzida pelo LPS, contribuindo apenas de forma indireta ao ser liberada posteriormente à bradicinina, não sendo, portanto, essencial para os efeitos causados pelo LPS.

Estes dados confirmam que a dose de 1 mg/kg do SR140333 é suficiente para exercer um efeito farmacológico e assim, que o aumento da permeabilidade vascular promovido pela substância P é decorrente, pelo menos em parte, da sua ligação aos receptores NK1. Isto sugere que os efeitos desencadeados pelo LPS não dependem das ações periféricas da substância P, mediadas pelos receptores NK1. Porém, tanto a resposta febril quanto o extravasamento plasmático exigem doses altas de LPS para sua indução e, particularmente, na resposta febril estas doses devem ser altas o suficiente para causar uma resposta sistêmica. Assim, procuramos avaliar se em uma resposta local, como na migração celular em resposta ao LPS, a participação da substância P poderia ser mais evidente.

A presença de LPS no sangue é freqüentemente associada à circulação de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8, C5a e outros mediadores solúveis que modulam a função neutrofílica (para revisão ver WAGNER e ROTH, 2000). O tipo celular primário responsivo a esses efeitos é o macrófago, que sintetiza grandes quantidades de IL-1 e TNF- $\alpha$  em resposta ao LPS (GALLIN et al., 1992). Essas citocinas, por sua vez,

são as principais responsáveis pelos efeitos indiretos do LPS na migração de PMN induzindo a síntese de moléculas de adesão (FERRÁNDIZ e FOSTER, 1991).

Como mencionado anteriormente, também existem vários trabalhos que mostram uma participação direta da substância P na resposta inflamatória (para revisão ver REINKE e FABRY, 2006). YARAE et al. (2003) e DELGADO et al. (2003) verificaram que a substância P é capaz de ativar células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos e granulócitos de camundongos e ratos, e induzir um aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias por essas células (IL-1, TNF- $\alpha$ ), o que poderia contribuir com a migração celular. Como TNF- $\alpha$  e IL-1 atuam induzindo a síntese de moléculas de adesão e liberação de quimiotáticos para neutrófilos (HUBER et al., 1991; KUIJPERS et al., 1992; MICHEL et al., 2006), torna-se clara a contribuição efetiva das mesmas na migração de neutrófilos. No entanto, não existem evidências de que esta participação ocorra durante a migração celular promovida por LPS.

Em nossos primeiros experimentos de migração celular, a administração de substância P na dose de 30 nmol/kg, aumentou significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (figura 3). Este efeito da substância P pode estar associado à sua capacidade de induzir citocinas quimiotáticas (HUBER et al., 1991; KUIJPERS et al., 1992; MICHEL et al., 2006), bem como à sua capacidade de induzir moléculas de adesão, como a E-selectina, P-selectina e a ICAM-1, importantes para o extravasamento de leucócitos, como mencionado anteriormente (MATIS et al., 1990; SMITH et al., 1993; NAKAGAWA et al., 1995).

Ainda, a administração de substância P seguida da administração de LPS, em doses subliminares de cada um (10 nmol/kg e 0,2  $\mu$ g/kg, respectivamente), também aumentou significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (figura 4). Resultado semelhante foi obtido por COSTA et al. (2006), onde os autores observaram um aumento na atividade da enzima mieloperoxidase (uma indicativa da presença de neutrófilos), na pele de camundongos co-estimulados com TNF- $\alpha$  e Substância P, em doses também subliminares de cada um.

Provavelmente este efeito é decorrente de uma maior ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, considerando que tanto substância P (MARRIOTT, et al., 2000; SUN et al., 2007) quanto LPS (MÜLLER et al., 1993) e TNF- $\alpha$  (VILCEK e LE, 1994) são capazes de ativar este fator de transcrição e, então, induzir uma maior produção

de mediadores inflamatórios, importantes para a migração celular. Reforçando essa hipótese, BERMAN et al., em 1996, verificaram que a pré-incubação de macrófagos peritoniais de ratos com substância P aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS.

Esses resultados sugerem que a substância P pode modular a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, induzida pelo LPS, mas não confirmam sua liberação durante a estimulação com esta endotoxina. Assim, fomos então verificar o papel da substância P endógena, atuando via receptor NK1, utilizando o antagonista seletivo de NK1, SR140333, no número de células residentes na cavidade peritoneal, e na migração celular induzida por LPS.

Existem diversos estudos mostrando que os receptores NK1 são importantes para o desencadeamento da resposta imune inata, participando desde o desenvolvimento das células (monócitos/macrófagos, por exemplo) até a regulação da atividade das mesmas (para revisão ver TULUE et al., 2009). Porém, em nosso experimento observamos que a administração intraperitoneal do SR140333, na dose de 1,0 mg/kg, não foi capaz de alterar de maneira significativa o número de leucócitos na cavidade peritoneal, quando comparado ao grupo controle (figura 5). Este resultado, no entanto, não excluiu a possibilidade do SR140333 modificar a atividade dos leucócitos residentes na cavidade peritoneal e, assim, interferir na migração de neutrófilos induzida por LPS.

A administração de LPS nas doses de 0,3, 1,0 ou 3,0 µg/kg na cavidade peritoneal, aumentou significativamente a migração de neutrófilos para o local (figura 6). Resultados semelhantes foram obtidos por NAKAMURA et al. (2001) e por GIEBELEN et al. (2007).

O antagonista SR140333, administrado por via intraperitoneal nas doses de 0,3 ou 1,0 mg/kg, não foi capaz de modificar a migração de leucócitos induzida pelo LPS 0,3 µg/kg (figura 7), sugerindo que o receptor NK1, como nas respostas anteriores, não tem uma participação relevante neste processo desencadeado por esta endotoxina. Ainda, considerando que o receptor NK1 é o principal receptor para atuação da substância P, é provável que a substância P endógena não contribua para a migração de neutrófilos induzida por LPS.

Nosso resultado está em acordo com o estudo feito por ELEKES, et al. (2007), no qual foi observada a incapacidade do SR140333 em reduzir o acúmulo de neutrófilos induzido por LPS, num modelo de inflamação das vias aéreas, em

camundongos. Neste estudo, o acúmulo de neutrófilos foi reduzido somente pelo tratamento com o antagonista do receptor do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), ou pela associação de antagonistas dos receptores NK1 e NK2. Resultado semelhante foi obtido por VERON et al. (2004), no qual a administração conjunta dos antagonistas de receptores NK1 e NK2 reduziu o número de neutrófilos no lavado broncoalveolar de ratos estimulados com LPS.

Soma-se a isto o fato de que, as neurocininas endógenas não são altamente seletivas para os seus receptores, podendo atuar em todos os receptores para neurocininas (NK1, NK2 e NK3), se estiverem altas concentrações ou se os receptores de sua maior afinidade não estiverem disponíveis (REGOLI et al., 1994).

Assim, a inefetividade do SR140333 em reduzir a migração de neutrófilos induzida pelo LPS pode ser devida ao fato da substância P estar atuando em outros receptores que não o NK1 ou, ainda, por mecanismos independentes de qualquer receptor. Um exemplo é a estimulação pela substância P, da quimiotaxia de PMNs pela sua ligação ao receptor do fMLP (para revisão ver KAVELAARS, et al., 1994).

Como citado anteriormente, existem estudos que demonstram a participação da substância P na migração celular, utilizando o mesmo antagonista utilizado neste estudo, o SR140333, em respostas inflamatórias induzidas por outros estímulos, como na peritonite induzida por formalina (SANTOS et al., 2004) e no modelo de pleurisia induzido por veneno de *P. nigriventer* (PVN) (COSTA et al., 2002). É possível que esses autores tenham observado um efeito pronunciado do SR140333, por terem utilizados estímulos que exercem inúmeros efeitos no sistema nervoso periférico, inclusive nas fibras C e A $\delta$ , que são as principais fontes de substância P. Ou seja, são estímulos que, reconhecidamente, ativam a liberação de substância P endógena para desencadear seus efeitos; diferente do LPS que ativa uma gama de células residentes aumentando a síntese de interleucinas, quimiocinas e moléculas de adesão, para desencadear uma resposta inflamatória como a migração celular.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que a substância P endógena, liberada periféricamente, não tem um papel relevante na manutenção das respostas inflamatória e febril desencadeadas pelo LPS.

Em estudos anteriores foi demonstrado que a vagotomia subdiafragmática reduziu a resposta febril e a migração celular induzida por LPS (WERNER et al., 2003). Com relação à migração celular, esta redução deveu-se basicamente por uma redução no número de células residentes no peritônio, 15 dias após o

procedimento cirúrgico. Neste estudo, aventamos a possibilidade de que a ausência de substâncias liberadas pelo nervo vago, como a acetilcolina e a substância P, poderiam ser responsáveis por estes efeitos. Posteriormente, avaliamos a participação da acetilcolina nestas respostas. Em 2005, POCHAPSKI demonstrou que a acetilcolina, provavelmente liberada do nervo vago de maneira aguda, modula a resposta febril e a migração celular induzidas por LPS através da ativação de receptores nicotínicos em macrófagos. Esse efeito está relacionado, pelo menos em parte, a uma redução na liberação de TNF- $\alpha$ . No presente estudo, avaliamos, de maneira similar, a participação da substância P através da ativação de receptores NK1. Então, estes dados em conjunto, sugerem que a acetilcolina proveniente das fibras vagais tem uma participação mais relevante do que a substância P, liberada perifericamente, na sinalização destas respostas, pelo menos no que diz respeito ao LPS.

Existem diversos estudos que demonstram que a substância P liberada no SNC participa da resposta febril induzida por LPS. O passo seguinte foi, então, investigar o papel da substância P presente no SNC, na resposta febril utilizando o SR140333.

A administração intracerebroventricular (icv) do antagonista SR140333, nas doses de 1,0 ou 3,0  $\mu$ g/rato, 30 minutos antes da administração intraperitoneal do LPS (30  $\mu$ g/kg), reduziu significativamente (33% e 57%, respectivamente) a resposta febril induzida pelo LPS (figuras 8B e 8C, respectivamente). Nosso resultado confirma estudos anteriores que utilizaram outros antagonistas de receptores NK1 e que evidenciam a participação da substância P central na febre induzida por LPS (SZELÉNYI et al., 1997; BALASKO et al., 2000). Dados de uma revisão publicada por Blatteis (1992) sugerem que os pirógenos endógenos circulantes, induzidos pelo LPS, por exemplo, interagem com elementos sensoriais na OVLT e que a substância P parece ser um dos neurotransmissores envolvidos. Ele propõe que a substância P afeta os neurônios termorreguladores presentes na área pré-óptica do hipotálamo diretamente, ou induz a síntese de citocinas que então atuariam nesses neurônios para desencadear a resposta febril. Como a dose de 3,0  $\mu$ g/rato do antagonista reduziu totalmente a febre induzida pelo LPS, sem alterar a temperatura corporal basal dos animais (figura 8D), utilizamos esta dose nos experimentos seguintes.

Num segundo momento avaliamos o efeito da substância P exógena na temperatura corporal (Tc) dos animais. A administração de SR140333 (3 µg/rato, icv) reduziu significativamente (60%) o aumento da Tc induzido pela substância P (500 ng/rato, icv), 30 minutos após a administração de captopril (5 µg/rato, icv) (figura 9). O captopril foi utilizado neste experimento por ser um inibidor da enzima conversora de angiotensina I (ECA), que tem sido relatada como uma das enzimas responsáveis pela degradação da substância P, inclusive no SNC (CASCIERI, et al., 1983; para revisão, ver SKIDGEL e ERDOS, 2004; CYRINO et al., 2002). O uso de captopril fez-se necessário porque a injeção de substância P icv em animais não-tratados com esta droga não modificou a Tc dos animais (resultado não mostrado).

Confirmamos que este aumento na Tc induzido pela administração de substância P é mediado pelos receptores NK1. Este efeito pode ser decorrente da capacidade da substância P afetar a atividade de neurônios sensíveis e insensíveis à temperatura (SHIBATA et al., 1988; BLATTEIS et al., 1994), de induzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias que podem desencadear a febre (YARAE et al., 2003; DELGADO et al., 2003) e/ou decorrente da liberação de PGs, considerando que o tratamento de cobaias (*guinea pigs*) com indometacina, inibidor da síntese desses mediadores da resposta febril (VANE, 1971; STRIJBOS et al., 1992), aboliu o aumento de temperatura induzido pela injeção central (intra-pré-optica) de substância P (BLATTEIS et al., 1994). Este resultado reforça a importância da substância P na regulação da Tc, como sugerido por diversos autores (DIB, 1987; BALASKÓ et al., 2000; TKACHENKO et al., 2006).

Como mencionado anteriormente, diversos mediadores participam da resposta febril induzida por LPS. Nós decidimos primeiramente investigar se a substância P, através dos receptores NK1, participa da resposta febril induzida por IL-1β, um dos mais importantes pirogênicos endógenos (LONG et al., 1990; ROTHWELL, 1991). Isto se deve ao fato de que a IL-1β é uma das primeiras citocinas a ser induzida/liberada após a administração de LPS e que as fibras aferentes, principal fonte de substância P no organismo, são importantes para a fase inicial da resposta febril induzida pelo LPS (para revisão, ver ROTH et al., 2009). Além disso, existem algumas evidências de que a IL-1β é capaz de induzir a liberação de substância P *in vitro* a partir de células da medula espinhal de ratos (MALCANGIO, et al., 1996) e de neurônios aferentes primários, através de mecanismos que envolvem a via dos prostanóides (INOUE et al., 1999), o que

poderia contribuir para o desenvolvimento da febre, uma vez que as PGs são um dos mais importantes mediadores desta resposta (VANE, 1971; STRIJBOS et al., 1992). Recentemente, SKOFF et al. (2009) observaram a capacidade da IL-1 $\beta$  e, principalmente, da IL-1 $\alpha$  de aumentarem *in vitro* a expressão de substância P em cultura de neurônios da raiz dorsal de ratos adultos.

Em nosso experimento, a administração icv de IL-1 $\beta$  na dose de 3,12 ng/rato, promoveu um aumento significativo da temperatura corporal, o que está em acordo com dados da literatura (ZAMPRONIO et al., 2000; WERNER et al., 2006). Para a nossa surpresa, embora a administração de SR140333 (3  $\mu$ g, icv) tenha sido capaz de abolir a resposta febril induzida por LPS, este antagonista não foi capaz de reduzir a febre desencadeada pela IL-1 $\beta$  (figura 10), sugerindo que a substância P não participa da febre desta citocina.

Alguns estudos mostram que a substância P é capaz de induzir a liberação de citocinas como a IL-1 $\beta$  em várias células (LEE e DOUGLAS, 1994; YARAEI et al., 2003; DELGADO et al., 2003). Além disso, estudos com animais vagotomizados sugerem que as fibras aferentes (vagais e não vagais), têm papel relevante na fase inicial da resposta febril (para revisão ver SZÉKELY et al., 2000; BLATTEIS, 2007). Desta forma, estando a substância P presente nessas fibras, é possível que este neuropeptídeo atue previamente a qualquer citocina induzida pelo LPS, ou que contribua para a efetivação da resposta febril induzida por outros pirogênicos liberados concomitantemente ou anteriormente à IL-1 $\beta$ . No entanto, qualquer suposição a este respeito seria prematura e estudos subseqüentes são necessários para esclarecer melhor esta questão.

## **6. CONCLUSÃO**



Os resultados obtidos permitem concluir que:

- A administração sistêmica do antagonista SR140333, não é capaz de modificar a resposta febril, o extravasamento plasmático ou a migração celular induzidos por LPS, sugerindo que as ações da substância P liberada periféricamente, mediadas através dos receptores NK1, não são importantes para o desenvolvimento das respostas inflamatória e febril induzidas por LPS.
- A administração central, via intracerebroventricular (icv), do SR140333, reduz significativamente a resposta febril induzida por LPS, sugerindo que a substância P presente no sistema nervoso central participa, através dos receptores NK1, da resposta febril induzida pelo LPS.
- A administração central (icv) do SR140333, não é capaz de modificar a resposta febril induzida por interleucina (IL)-1 $\beta$ , sugerindo que a substância P seja liberada previamente a esta citocina, embora possa fazer parte de outras vias envolvidas na resposta febril do LPS.

## **REFERÊNCIAS**

AKARSU, E. S.; MAMUK, S. *Escherichia coli* lipopolysaccharides produce serotype-specific hypothermic response in biotelemetered rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.292, n.5, p.R1846-R1850, 2007.

ALBELDA, S. M.; SMITH, C. W.; WARD, P. A. Adhesion molecules and inflammatory injury. **The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.8, p.504-512, 1994.

ALTIERI, D. C.; EDGINGTON, T.S. A monoclonal antibody reacting with distinct adhesion molecules defines a transition in the functional state of the receptor CD11b/CD18 (Mac-1). **Journal of Immunology**, v.141, p.2656-2660, 1988.

BALASKÓ, M.; SZÉKELY M.; SZELENYI, Z. The effect of CP-96,345, a non-peptide substance P antagonist, on thermoregulation and the development of endotoxin-fever in rats. **Journal of Thermal Biology**, v.25, p.1-4, 2000.

BANKS, W. A.; KASTIN, A. J.; BROADWELL, R. D. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. **Neuroimmunomodulation**, v.2, p.241-248, 1995.

BARNES, P. J.; CHUNG, K. F.; PAGE, C. P. Inflammatory mediators of asthma: an update. **Pharmacological Reviews**, v.50, n.4, p.515-596, 1998.

BENAMAR, K.; XIN, L.; GELLER, E.B.; ADLER, M.W. Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by a  $\mu$ -opioid receptor-selective antagonist in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.401, p.161-165, 2000.

BENAMAR, K.; YONDORF, M.; MEISSLER, J. J.; GELLER, E. B.; TALLARIDA, R. J.; EISENSTEIN, T. K.; ADLER, M. W. A novel role of cannabinoids: implication in the fever induced by bacterial lipopolysaccharide. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.320, n.3, p.1127-1133, 2007.

BERMAN, A. S.; CHANCELLOR-FREELAND, C.; ZHU, G.; BLACK, P. H. Substance P primes murine peritoneal macrophages for an augmented proinflammatory cytokine response to lipopolysaccharide. **Neuroimmunomodulation**, v.3, p.141-149, 1996.

BERTRAND, C.; NADEL, J. A.; YAMAWAKI, I.; GEPPETTI, P. Role of kinins in the vascular extravasation evoked by antigen and mediated by tachykinins in guinea pig trachea. **Journal of Immunology**, v.151, n.9, p.4902-4907, 1993.

BERTRAND, C.; GEPPETTI, P.; BAKER, J.; PETERSSON, G.; PIEDIMONTE, G.; NADEL, J. A. Role of peptidases and NK1 receptors in vascular extravasation induced by bradykinin in rat nasal mucosa. **Journal of Applied Physiology**, v.74, n.5, p.2456-2461, 1993b.

BEVILACQUA, M. P.; NELSON, R. M. Selectins. **The Journal of Clinical Investigation**, v.91, p.379-387, 1993.

- BHARGAVA, K. P.; NATH, R.; PALIT, G. Nature of histamine receptors concerned in capillary permeability. **British Journal of Pharmacology**, v.59, n.2, p.349-51, 1977.
- BLACK, P. H. Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. **Brain, Behavior and Immunity**, v.16, p.622-653, 2002.
- BLATTEIS, C. M. Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. **Progress in Brain Research**, v.91, p. 409-412, 1992.
- BLATTEIS, C. M. Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics**, v.111, n.1, p.194-223, 2006.
- BLATTEIS, C. M. The onset of fever: new insights into its mechanism. **Progress in Brain Research**, v.162, p.3-14, 2007.
- BLATTEIS, C. M.; BEALER, S. L.; HUNTER, W. S.; LLANOS-Q, J.; AHOKAS, A. A.; MASHBURN, Jr. T. A. Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle of guinea pigs. **Brain Research Bulletin**, v.11, p.519-526, 1983.
- BLATTEIS, C. M.; XIN, L.; QUAN, N. Neuromodulation of fever: a possible role for substance P. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.741, p.162-173, 1994.
- BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. Cytokines and fever. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.840, p.608-618, 1998.
- BOROVIKOVA, L. V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M.; YANG, H.; BOTCHKINA, G. L.; WATKINS, L. R.; WANG, H.; ABUMRAD, N.; EATON, J. W.; TRACEY, K. J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v.405, p.458-462, 2000.
- BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v.89, p.3503-3521, 1997.
- BOST, K. L.; BREEDING, S. A. L.; PASCUAL, D. W. Modulation of the m RNAs encoding SP and its receptor in rat macrophages by LPS. **Regional Immunology**, v.4, p.105-112, 1992.
- BOWDEN, J. J.; GARLAND, A. M.; BALUK, P.; LEFEVRE, P.; GRADY, E. F.; VIGNA, S. R.; BUNNETT, N. W.; McDONALD, D. M. Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors at sites of inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, p.8964-8968, 1994.
- BRIMIJOIN, S.; LUNDBERG, J. M.; BRODIN, E.; HÖKFELT, T.; NILSSON, G. Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig. **Brain Research**, v.191, p.443-457, 1980.

BROWN, E. J. Phagocytosis. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Development Biology**, v.17, n.2, p.109-17, 1995.

BROWN, E. J. Adhesive interactions in the immune system. **Trends in Cell Biology**, v.7, p.289-295, 1997.

BROWN, M. R.; FISHER, L. A.; RIVIER, J.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; VALE, W. Corticotropin-releasing factor: effects on the sympathetic nervous system and oxygen consumption. **Life Sciences**, v.30, p.207-210, 1982.

CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. **The American Journal of Physiology**, v.272, n.6, p.R1712-1725, 1997.

CARTER, J. E.; KRAUSE, J. E. Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. **The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience**, v.10, p.2203-2214, 1990.

CASCIERI, M. A.; BULL, H. G.; MUMFORD, R. A.; PATCHETT, A. A.; THORNBERRY, N. A.; LIANG, T. Carboxyl-terminal tripeptidyl hydrolysis of substance P by purified rabbit lung angiotensin-converting enzyme and the potentiation of substance P activity in vivo by captopril and MK-422. **Molecular Pharmacology**, v.25, p.287-293.

CELLIER, E.; BARBOT, L.; IYENGAR, S.; COUTURE, R. Characterization of central and peripheral effects of septide with the use of five tachykinin NK1 receptor antagonists in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v.127, p.717-728, 1999.

CHANOCK, S. J.; EL BENNA, J.; SMITH, R. M.; BABIOR, B. M. **The respiratory burst oxidase**. The Journal of Biological Chemistry, v.269, n.40, p.24519-24522, 1994.

COELHO, M. M.; LUHESHI, G.; HOPKINS, S. J.; PELÁ, I. R.; ROTHWELL, N. J. Multiple mechanisms mediate antipyretic action of glucocorticoids. **The American Journal of Physiology**, v.269, n.3, p.527-535, 1995.

COOKE, H. J.; FOX, P.; ALFERES, L.; FOX, C. C.; WOLFE, S. A. Jr. Presence of NK1 receptors on a mucosal-like mast cell line, RBL-2H3 cells. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.76, p.188-193, 1998.

COSTA, S. K.; MORENO, R. A.; ESQUISATTO, L. C. M.; JULIANO, L.; BRAIN, S. D.; de NUCCI, G.; ANTUNES, E. Role of kinins and sensory neurons in the rat pleural leukocyte migration induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. **Neuroscience Letters**, v.318, p.158-162, 2002.

COSTA, S. K.; YSHII, L. M.; POSTON, R. N.; MUSCARÁ, M. N.; BRAIN, S. D. Pivotal role of endogenous tachykinins and the NK1 receptor in mediating leukocyte accumulation, in the absense of oedema formation, in response to TNF $\alpha$  in the

cutaneous microvasculature. **Journal of Neuroimmunology**, v.171, n.1-2, p.99-109, 2006.

CRONSTEIN, B. N.; WEISSMANN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v.36, n.2, p.147-157, 1993.

CYRINO, L. A.; CARDOSO, R. C.; HACKL, L. P.; NICOLAU, M. Effect of quercetin on plasma extravasation in rat CNS and dura mater by ACE and NEP inhibition. **Phytotherapy research**, v.16, p.545-549, 2002.

DAVATELIS, G.; WOLPE, S. D.; SHERRY, B.; DAYER, J. M.; CHICHEPORTICHE, R.; CERAMI, A. Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. **Science**, v.243, n.4894, p.1066-1068, 1989.

DELGADO, A. V.; McMANUS, A. T.; CHAMBERS, J. P. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. **Neuropeptides**, v.37, p.355-361, 2003.

DeRIJK, R. H.; BERKENBOSCH, F. Hypothermia to endotoxin involves the cytokine tumor necrosis factor and the neuropeptide vasopressin in rats. **The American Journal of Physiology**, v.266, p.R9-R14, 1994.

DeRIJK, R. H.; VAN KAMPEN, M.; VANROOIJEN, N.; BERKENBOSCH, F. Hypothermia to endotoxin involves reduced thermogenesis, macrophage-dependent mechanisms, and prostaglandins. **The American Journal of Physiology**, v.266, p.R1-R8, 1994.

DIAMANT, M.; DE WIED, D. Autonomic and behavioral effects of centrally administered corticotropin-releasing factor in rats. **Endocrinology**, v.129, p.446-454, 1991.

DIB, B. Thermoregulatory behavior induced by intrathecal injection of substance P in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v.133, n.2, p.147-153, 1987.

DIKEAKOS, J. D.; REUDELHUBER, T. L. Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out. **The Journal of Cell Biology**, v.177, p.191-196, 2007.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Reviews of Infectious diseases**, v.6, p.51-95, 1984.

DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; WOLFF, S. M.; BERNHEIM, H. A.; BEUTLER, B.; CERAMI, A.; FIGARI, I. S.; PALLADINO, M. A. Jr.; O'CONNOR, J. V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. **The Journal of Experimental Medicine**, v.163, n.6, p.1433-1450, 1986.

DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; MANCILLA, J.; BISHAI, I.; LEES, J.; COCEANI, F. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but

not in peripheral blood mononuclear cells. **Brain Research**, v.562, n.2, p.199-206, 1991.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Advances in Pharmacology**, v.25, p.21–51, 1994.

DINARELLO, C. A. Cytokines as endogenous pyrogens. **The Journal of Infectious Diseases**, v.179, n.2, p.S294-304, 1999.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; VOGEL, S. N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes and Infection**, v.4, p.903-914, 2002.

DOGAN, M. D.; ATAOGU, H.; AKARSU, E. S. Effects of different serotypes of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on body temperature in rats. **Life Sciences**, v.67, p.2319-2329, 2000.

ELEKES, K.; HELYES, Z.; NÉMETH, J.; SÁNDOR, K.; POZSGAI, G.; KERESKAI, L.; BÖRZSEI, R.; PINTÉR, E.; SZABÓ, A.; SZOLCSÁNYI, J. Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory neuropeptides in endotoxin-induced airway inflammation and consequent bronchial hyperreactivity in the mouse. **Regulatory peptides**, v.141, n.1-3, p.44-54, 2007.

ELMQUIST, J. K.; SCAMMELL, T. E.; JACOBSON, C. D.; SAPER, C. B. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. **The Journal of Comparative Neurology**, v.371, n.1, p.85-103, 1996.

ELMQUIST, J. K.; SCAMMELL, T. E.; SAPER, C. B. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. **Trends in Neurosciences**, v.20, n.12, p.565-570, 1997.

ESKAY, R. L.; EIDEN, L. E. Interleukin-1 $\alpha$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  differentially regulate enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide, neurotensin, and substance P biosynthesis in chromaffin cells. **Endocrinology**, v. 130, p.2252, 1992.

FABRICIO, A. S.; SILVA, C. A.; RAE, G. A.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SOUZA, G. E. Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (*E. coli*) in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.125, n.3, p.542-548, 1998.

FABRÍCIO, A. S.; RAE, G. A.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G. E. Endothelin-1 as a central mediator of LPS-induced fever in rats. **Brain Research**, v.1066, p.92-100, 2005a.

FABRÍCIO, A. S.; VEIGA, F. H.; CRISTOFOLETTI, R.; NAVARRA, P.; SOUZA, G. E. The effects of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1-induced fever in rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.288, n.3, p.R671–R677, 2005b.

FABRÍCIO, A. S.; RAE, G. A.; ZAMPRONIO, A. R.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G. E. Central endothelin ETB receptors mediate IL-1-dependent fever induced by pre-formed pyrogenic factor and corticotropin-releasing factor in the rat. **American**

**Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.25(agosto), 2006.

FAGARASAN, M.O., AIELLO, F., MUEGGE, K., DURUM, S., AXELROD, J. Interleukin 1 induces beta-endorphin secretion via Fos and Jun in AT-20 pituitary cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.20, p.7871-7874, 1990.

FERRÁNDIZ, M. L.; FOSTER, S. J. Tumour necrosis factor production in a rat airpouch model of inflammation: role of eicosanoids. **Agents Actions**, v.32, n.3-4, p.289-294, 1991.

FERREIRA, S. H. Are macrophages the body's alarm cells? **Agents Actions**, v.10, n.3, p.229-230, 1980.

FRAGA, D. **Participação dos opióides endógenos na termorregulação e na resposta febril**. 2004. 111f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v.294, p.1871-1875, 2001.

GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. 2. ed. New York: Raven Press, 1992.

GARCIA, M.; SAKAMOTO, K.; SHIGEKAWA, M.; NAKANISHI, S.; ITO, S. Multiple mechanisms of arachidonic acid release in Chinese hamster ovary cells transfected with cDNA of substance P receptor. **Biochemical Pharmacology**, v.48, n.9, p.1735-1741, 1994.

GIEBELEN, I. A.; VAN WESTERLOO, D. J.; LAROSA, G. J.; DE VOS, A. F.; VAN DER POLL, T. Stimulation of alpha 7 cholinergic receptors inhibits lipopolysaccharide-induced neutrophil recruitment by a tumor necrosis factor alpha-independent mechanism. **Shock (Augusta, Ga.)**, v.27, n.4, p.443-447, 2007.

GOEHLER, L. E.; RELTON, J. K.; DRIPPS, D.; KIECHLE, R.; TARTAGLIA, N.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication. **Brain Research Bulletin**, v.43, p.357-364, 1997.

GOEZY, B.; KATO, L. Role of histamine and serotonin in alterations of capillary permeability following injury. **Dermatologica**, v.127, p.403-409, 1963.

HANSEN, M. K.; DANIELS, S.; GOEHLER, L. E.; GAYKEMA, R. P. A.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Subdiaphragmatic vagotomy does not block intraperitoneal lipopolysaccharide-induced fever. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v.85, p.83-87, 2000.

HANSEN, M. K.; O'CONNOR, K. A.; GOEHLER, L. E.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. The contribution of the vagus nerve in interleukin-1 $\alpha$ -induced fever is dependent on



dose. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.280, p.R929-R934, 2001.

HARE, A. S.; CLARKE, G.; TOLCHARD, S. Bacterial lipopolysaccharide-induced changes in FOS protein expression in the rat brain: correlation with thermoregulatory changes and plasma corticosterone. **Journal of Neuroendocrinology**, v.7, n.10, p.791-799, 1995.

HARRE, E. M.; ROTH, J.; PEHL, U.; KUETH, M.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHLE, T. Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. **Journal of Applied Physiology**, v.92, n.6, p.2657-2666, 2002.

HARRISON, S.; GEPPETTI, P. Review: Substance P. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.33, p.555-576, 2001.

HAZIOT, A.; KATZ, I.; RONG, G. W.; LIN, X. Y.; SILVER, J.; GOYERT, S. M. Evidence that the receptor for soluble CD14:LPS complexes may not be the putative signal-transducing molecule associated with membrane-bound CD14. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.46, p.242-245, 1997.

HELLE, M.; BRAKENHOFF, J. P.; DE GROOT, E. R.; ARDEN, L. A. Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. **European Journal of Immunology**, v.18, p.957-959, 1988.

HIRASAWA, N.; TORIGOE, M.; OHGAWARA, R.; MURAKAMI, A.; OHUCHI, K. Involvement of MAP kinases in lipopolysaccharide-induced histamine production in RAW 264 cells. **Life Sciences**, v.80, n.1, p.36-42, 2006.

HO, W. Z.; LAI, J. P.; ZHU, X. H.; UVAYDOVA, M.; DOUGLAS, S. D. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. **Journal of Immunology**, v.159, p.5654-5660, 1997.

HUBER, A. R.; KUNKEL, S. L.; TODD, R. F. 3<sup>rd</sup>; WEISS, S. J. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. **Science**, v.254, n.5028, p.99-102, 1991.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v.69, p.11-25, 1992.

HURST, S. M.; STANISZ, A. M.; SHARKEY, K. A.; COLLINS, S. M. Interleukin-1 $\beta$ -induced increase in substance P in rat myenteric plexus. **Gastroenterology**, v.105, p.1754, 1993.

ICHIKAWA, H.; HELKE, C. J. Coexistence of calcium-binding proteins in vagal and glossopharyngeal sensory neurons of the rat. **Brain Research**, v.1-2, p.349-353, 1997.

INOUE, A.; IKOMA, K.; MORIOKA, N.; KUMAGAI, K.; HASHIMOTO, T.; HIDE, I.; NAKATA, Y. Interleukin-1 $\beta$  induces substance P release from primary afferent

neurons through the cyclooxygenase-2 system. **Journal of Neurochemistry**, v.73, p.2206-2213, 1999.

JACQUES, L.; COUTURE, R.; DRAPEAU, G.; REGOLI, D. Capillary permeability induced by intravenous neurokinins. Receptor characterization and mechanism of action. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.340, n.2, p.170-179, 1989.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WOLPORT, M. P.; COPRA J. D. **Immunobiology: The immune system in health and disease**. New York: Garland, 1999.

JIANG, Q.; AKASHI, S.; MIYAKE, K.; PETTY, H. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF $\kappa$ B. **Journal of Immunology**, v.165, p.3541-3544, 2000.

JOOS, G. F.; GERMONPRE, P. R.; PAUWELS, R. A. Role of tachykinins in asthma. **Allergy**, v.55, n.4, p.321-337, 2000.

JUNG, M.; CALASSI, R.; MARUANI, J. Neuropharmacological characterization of SR 140333, a non peptide antagonist of NK1 receptors. **Neuropharmacology**, v.33, n.2, p.167-179, 1994.

KAVELAARS, A.; JEURISSEN F.; HEIJNEN, C. J. Substance P receptors and signal transduction in Leukocytes. **Immunomethods**, v.5, p.41-48, 1994.

KAY, R. R.; LANGRIDGE, P.; TRAYNOR, D.; HOELLER, O. Changing directions in the study of chemotaxis. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v.9, n.6, p.455-463, 2008.

KELLER, H. U.; WISSLER, J. H.; HESS, M. W.; COTTIER, H. Relation between stimulus intensity and neutrophil chemotactic response. **Experientia**, v.33, n.4, p.534-536, 1977.

KHANDOGA, A. G.; KHANDOGA, A.; REICHEL, C. A.; BIHARI, P.; REHBERG, M.; KROMBACH, F. In vivo imaging and quantitative analysis of leukocyte directional migration and polarization in inflamed tissue. **PloS One**, v.4, n.3, p.e4693.

KILLINGSWORTH, C. R.; SHORE, S. A.; ALESSANDRINI, FL; DEY, R. D.; PAULAUSKIS, J. D. Rat alveolar macrophages express preprotachykinin gene-I mRNA-encoding tachykinins. **The American Journal of Physiology**, v.273, p.L1073-L1081, 1997.

KLEIN, C. L.; BITTINGER, F.; KOHLER, H.; WAGNER M.; OTTO, M.; HERMANNNS, I.; KIRKPATRICK, C. J. Comparative studies on vascular endothelium in vitro. 3. Effects of cytokines on the expression of E-selectin, ICAM-1 e VCAM-1 by cultured human endothelial cells obtained from different passages. **Pathobiology**, v.65, p.83-92, 1995.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological Reviews**, v.71, n.1, p.93-127, 1991.

- KOHL, J.; BITTER-SUERMAN, D. Anaphylotoxins. In: **Complement in health and disease** (WHALEY, K.; LOOS, M.; WEILER, J. M. eds). Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, p. 299-324, 1993.
- KOMAKI, G.; ARIMURA, A.; KOVES, K. Effect of intravenous injection of IL-1 $\alpha$  on PGE<sub>2</sub> levels in several brain areas as determined by microdialysis. **The American Journal of Physiology**, v.262, p.E246-E251, 1992.
- KOMHOFF, M.; GRONE, H. J.; KLEIN, T.; SEYBERTH, H. W.; NÜSING, R. M. Localization of cyclooxygenase-1 e -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. **The American Journal of Physiology**, v.272, p.F460-F468, 1997.
- KOULCHITSKY, S. V. Does selective destruction of the vagal afferent inflow facilitate or reduce the development of fever? **Journal of Thermal Biology**, v.25, p.39-43, 2000.
- KOSHI, T.; EDANO, T.; ARAI, K.; SUZUKI, C.; EHARA, Y.; HIRATA, M.; OHKUCHI, M.; OKABE, T. Pyrogenic action of endothelin in conscious rabbit. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.186, n.3, p.1322-1326, 1992.
- KUIJPERS, T. W.; HAKKERT, B. C.; HART, M. H.; ROOS, D. Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8. **The Journal of Cell Biology**, v.117, n.3, p.565-572, 1992.
- LAI, J.P.; DOUGLAS, S.D.; HO, W.Z. Human lymphocytes express substance P and its receptor. **Journal of Neuroimmunology**, v.86, p.80-86, 1998.
- LAMBRECHT, B. N.; GERMONPRE, P. R.; EVERAERT, E. G.; CARRO-MUINO, I.; DE VEERMAN, M.; DE FELIPE, C.; HUNT, S. P.; THIELEMANS, K.; JOOS, G. F.; PAUWELS, R. A.; Endogenously produced substance P contributes to lymphocyte proliferation induced by dendritic cells and direct TCR ligation. **European Journal of Immunology**, v.29, p.3815-3825, 1999.
- LANGER, H. F.; CHAVAKIS, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.13, n.7, p.1211-1220, 2009.
- LASKIN, D.L.; PENDINO, K.J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.35, p.655-677, 1995.
- LAWRENCE, M. B.; SPRINGER, T.A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction and prerequisite for adhesion through integrins. **Cell**, v.65, p.859-873, 1991.
- LEDEBOER, A.; BINNEKADE, R.; BREVÉ, J. J. P.; BOL, J. G.; TILDERS, F. J.; VAN DAM, A. M. Site-specific modulation of LPS-induced fever and interleukin-1 $\beta$  expression in rats by interleukin-10. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.282, p.R1762-R1772, 2002.

LEE, H.R.; HO, W.Z.; DOUGLAS, S.D. Substance P augments tumor necrosis factor release in human monocyte-derived macrophages. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.1, n.4, p.419-423, 1994.

LeFEUVRE, R. A.; ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. Activation of brown fat thermogenesis in response to central injection of corticotropin releasing hormone in the rat. **Neuropharmacology**, v.26, p.1217-1221, 1987.

LONG, N. C.; OTTERNESS, I.; KUNKEL, S. L.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. **The American Journal of Physiology**, v.259, p.R724-R728, 1990.

LUSCINSKAS, F. W.; LAWLER, J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. **The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.8, p.929-938, 1994.

MAGGI, C.A. The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. **Regulatory peptides**, v.70, p.75-90, 1997.

MAJERUS, P.W. Prostaglandins: critical roles in pregnancy and colon cancer. **Current Biology: CB**, v.8, p.R87-R89, 1998.

MALCANGIO, M.; BOWERY, N. G.; FLOWER, R. J.; PERRETI, M. Effect of interleukin-1 $\beta$  on the release of substance P from rat isolated spinal cord. **European Journal of Pharmacology**, v. 299, p.113-118, 1996.

MALIK, A. R.; LO, S. K. Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. **Pharmacological Reviews**, v.48, p.213-229, 1996.

MANESS, L.M.; KASTIN, A.J.; BANKS, W.A. Relative contributions of a CVO and the microvascular bed to delivery of blood-borne IL-1 $\alpha$  to the brain. **The American Journal of Physiology**, v.275, p.E207-E212, 1998.

MARRIOTT, I.; MASON, M. J.; ELHOFY, A.; BOST, K. L. Substance P activates NF- $\kappa$ B independent of elevations in intracellular calcium in murine macrophages and dendritic cells. **Journal of Neuroimmunology**, v.102, p.163-171, 2000.

MARTIN, S. M.; MALKINSON, T. J.; VEALE, W. L.; PITTMAN, Q. J. Fever in pregnant, parturient, and lactating rats. **The American Journal of Physiology**, v.268, p.R919-R923, 1995.

MATIS, W. L.; LAVKER, R. M.; MURPHY, G. F. Substance P induces the expression of an endothelial-leukocyte adhesion molecule by microvascular endothelium. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.94, n.4, p.492-495, 1990.

MATSUBA, K. T.; van EEDEN, S. F.; BICKNELL, S. G.; WALKER, B. A. M.; HAYASHI, S.; HOGG, J. C. Apoptosis in circulating PMN: increased susceptibility in L-selectin-deficient PMN. **The American Journal of Physiology**, v.272, p.H2852-H2858, 1997.

MATSUMURA, K.; CAO, C.; WATANABE, Y. Prostaglandin system in the brain: sites of biosynthesis and sites of action under normal and hyperthermic states. **Progress in Brain Research**, v.115, p.275-295, 1998.

MATSUSHIMA, N.; TANAKA, T.; ENKHBAYAR, P.; MIKAMI, T.; TAGA, M.; YAMADA, K.; KUROKI, Y. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. **BMC Genomics**, v.8, p.124, 2007.

MERIGHI, A.; POLAK, J. M.; GIBSON, S. J.; GULBENKIAN, S.; VALENTINO, K. L.; PEIRONE, S. M. Ultrastructural studies on calcitonin gene-related peptide-, tachykinin- and somatostatin-immunoreactive neurones in rat dorsal root ganglia: evidence for the colocalization of different peptides in single secretory granules. **Cell and Tissue Research**, v.254, p.101-109, 1988.

MICHEL, O.; DENTENER, M.; CATALDO, D.; CANTINIEAUX, B.; VERTONGEN, F.; DELVAUX, C.; MURDOCH, R. D. Evaluation of oral corticosteroids and phosphodiesterase-4 inhibitor on the acute inflammation induced by inhaled lipopolysaccharide in human. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v.20, n.6, p.676-683, 2006.

MIÑANO, F. J.; SANCIBRIAN, M.; VISZCAINO, M.; PAEZ, X.; DAVATELIS, G.; FAHEY, T.; SHERRY, B.; CERAMI, A.; MYERS, R. D. Macrophage inflammatory protein-1: unique action on the hypothalamus to evoke fever. **Brain Research Bulletin**, v.24, p.849-852, 1990.

MIÑANO, F. J.; ARMENGOL, J. A.; SANCIBRIAN, M.; POMARES, F.; BENAMAR, K.; MYERS, R. D. Macrophage inflammatory protein-1 beta and inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in rat brain during prostaglandin E<sub>2</sub>- or lipopolysaccharide-induced fever. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.813, p.272-280, 1997.

MIÑANO, F.J.; TAVARES, E.; MALDONADO, R. Role of endogenous macrophage inflammatory protein-2 in regulating fever induced by bacterial endotoxin in normal and immunosuppressed rats. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v.31, n.10, p.723-731, 2004.

MIYAKE, K. Roles for accessory molecules in microbial recognition by toll-like receptors. **Journal of Endotoxin Research**, v.12, p.195-204, 2006.

MONHANKUMAR S. M. J.; MONHANKUMAR, P. S.; QUADRI, S. K. Effects of bacterial lipopolysaccharide on central monoamines and fever in the rat: involvement of the vagus. **Neuroscience Letters**, v.284, p.159-162, 2000.

MORIMOTO, A.; NAKAMORI, T.; WATANABE, T.; ONO, T.; MURAKAMI, N. Pattern differences in experimental fever induced by endotoxin, endogenous pyrogens, and prostaglandins. **The American Journal of Physiology**, v.254, n.4, p.R633-R640, 1988.

MORIMOTO, A.; MORIMOTO, K.; WATANABE, T.; SAKATA, Y.; MURAKAMI, N. Does an increase in prostaglandin E2 in the blood circulation contribute to a febrile response in rabbits? **Brain Research Bulletin**, v.29, p.189–192, 1992.

MÜLLER, J. M.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W.; BÄEUERLE, P. A. Nuclear factor kappa b, a mediator of lipopolysaccharide effects. **Immunobiology**, v.187, p.233-256, 1993.

MURAKAMI, N.; WATANABE, T. Activation of ACTH release is mediated by the same molecule as the final mediator, PGE2, of febrile response in rats. **Brain Research**, v.478, n.1, p.171-174, 1989.

NAKAGAWA, H.; KOMORITA, N.; SHIBATA, F.; IKESUE, A.; KONISHI, K.; FUJIOKA, M.; KATO, H. Identification of cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINC), rat GRO/CINC-2 and CINC-2, produced by granulation tissue in culture: purification, complete amino acid sequences and characterization. **The Biochemical Journal**, v.301, p.545-550, 1994.

NAKAGAWA, N.; SANO, H.; IWAMOTO, I. Substance P induces the expression of intercellular adhesion molecule-1 on vascular endothelial cells and enhances neutrophil transendothelial migration. **Peptides**, v.16, n.4, p.721-725, 1995.

NAKAMURA, H.; HERZENBERG, L. A.; BAI, J.; ARAYA, S.; KONDO, N.; NISHINAKA, Y.; HERZENBERG, L. A.; YODOI, J. Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.26, p.15143-15148, 2001.

NAKANISH, S. Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations, and regulation. **Physiological Reviews**, v.67, p.1117-1142, 1987.

NAMBI, P.; PULLEN, M.; SLIVJAK, M.J.; OHLSTEIN, E.H.; STORE, B.; SMITH, E.F. Identification of a novel endothelin receptor in *Xenopus laevis* liver. **Neuropeptides**, v.26, p.181-185, 1994.

NEUMANN, H.; WEKERLE, H. Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v.57, n.1-9, 1998.

NIIJIMA, A. The afferent discharges from sensors for interleukin 1 beta in the hepatportal system in the anesthetized rat. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v.61,n.3, p.287-291, 1996.

NOHGAWA, M.; SASADA, M.; MAEDA, A.; ASAGOE K.; HARAKAWA, N.; TACAÑO, K.; YAMAMOTO, K.; OKUMA, M. Leukotriene B<sub>4</sub> activated human endotelial cells promote transendothelial neutrophil migration. **Journal of Leukocyte Biology**, v.62, p.203-209, 1997.

OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiological Reviews**, v.73, p.229-308, 1993.

PARK, B. S.; SONG, D. H.; KIM, H. M.; CHOI, B. S. ; HAYYOUNG, L.; LEE, J. O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v.458, n.7242, p.1191-1195, 2009.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CAMPOS, M. M.; ARAÚJO, J. G.; PESQUERO, J. L.; SOUZA, G. E.; AVELLAR, M. C.; TEIXEIRA, M. M.; CALIXTO, J. B. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolyssacharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. **Journal of Immunology**, v.172, p.1839-1847, 2004.

PAUL, L.; VADIM, F.; KAPLANSKI, J. Evidence supporting involvement of leukotrienes in LPS-induced hypothermia in mice. **The American Journal of Physiology**, v.276, p.R52-R58, 1999.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior and Immunity**, v.19, n.6, p. 493-499, 2005.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2ªed. Academic Press, Sydney, Australia, 1986.

POCHAPSKI, M. T. **Controle colinérgico sobre macrófagos peritoneais residentes: influência na migração celular e resposta febril induzidas por LPS**. 2005. 92f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

POLTORAK, A.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; CITTERIO, S.; BEUTLER, B. Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, p.2163-2167, 2000.

RAETZ, C. R. Biochemistry of endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v.59, p.129-170, 1990.

RAETZ, C. R.; ULEVITCH, R. J.; WRIGHT, S. D.; SIBLEY, C. H.; DING, A.; NATHAN, C. F. Gram-negative endotoxin: extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. **The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.5, p.2652-2660, 1991.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v.71, p.635-700, 2002.

REGOLI, D.; BOUDON, A.; FAUCHERE, J. L. Receptors antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacological Reviews**, v.46, p.551-599, 1994.

REINKE, E.; FABRY, Z. Breaking or making immunological privilege in the central nervous system: the regulation of immunity by neuropeptides. **Immunology Letters**, v.104, p.102-109, 2006.

RIBEIRO, R. A.; SOUZA-FILHO, M. V.; SOUZA, M. H.; OLIVEIRA, S. H.; COSTA, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, H. S. Role of resident mast cells and macrophages in

the neutrophil migration induced by LTB<sub>4</sub>, fMLP and C5a des arg. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.112, p.27-35, 1997.

RIETSCHER, E. T.; BRADE, H. Bacterial endotoxins. **Scientific American**, v.267, n.2, p.54-61, 1992.

RIETSCHER, E. T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A. J.; ZÄHRINGER, U.; SEYDEL, U.; PADOVA, F. D.; SCHREIER, M.; BRADE, H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.8, n.2, p.217-225, 1994.

ROCHA e SILVA, M. A brief history of inflammation. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. VANE, J. R. e FERREIRA, S. H. (eds.), Springer-Verlag, v.50, p.6-25, 1978.

ROMANOVSKY, A. A. Review: Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: lessons from vagotomy. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v.85, p.39-48, 2000.

ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A. I.; BERTHOUD, H. R.; KULCHITSKY, V. A. Are vagal efferents involved in the fever response to intraperitoneal lipopolysaccharide? **Journal of Thermal Biology**, v.25, p.65-70, 2000.

ROMANOVSKY, A. A.; SZEKÉLY, M. Fever and hypothermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. **Medical Hypotheses**, v.50, p.219-226, 1998.

ROMER, L. H.; McLEAN, N. V.; YAN, H. C.; DAISE, M.; SUN, J.; DeLISSER, H. M. IFN-gamma and TNF-alpha induced redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. **Journal of Immunology**, v.154, p.6582-6592, 1995.

ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S. W.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.29, n.2, p.229-245, 2009.

ROTHWELL, N. J. Mechanisms of pyrogenic action of cytokines. **European Cytokine Network**, v.1, p.211-213, 1990.

ROTHWELL, N. J. Functions and mechanisms of interleukin-1 in the brain. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.12, n.11, p.430-436, 1991.

ROTHWELL, N. J. Sixteenth Gaddum Memorial Lecture December 1996. Neuroimmune interactions: the role of cytokines. **British Journal of Pharmacology**, v.121, n.5, p.841-847, 1997.

ROUSH, E. D.; KWATRA, M. M. Human substance P receptor expressed in Chinese hamster ovary cells directly activates G(alpha q/11), G(alpha s), G(alpha o). **FEBS Letters**, v.428, n.3, p.291-294, 1998.



RUMMEL, C.; BARTH, S. W.; VOSS, T.; KORTE, S.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHLE, T.; ROTH, J. Localized vs. systemic inflammation in guinea pigs: a role for prostaglandins at distinct points of the fever induction pathways? **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.289, n.2, p.R340–R347, 2005.

SAIA, R. S.; CARNIO, E. C. Thermoregulatory role of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-induced hypothermia. **Life Sciences**, v.79, n.15, p.1473-1478, 2006.

SANTOS, J. M.; TATSUO M. A.; TURCHETTI-MAIA, R. M.; LISBOA, M. C.; DeFRANCISCHI, J. N. Leukocyte recruitment to peritoneal cavity of rats following formalin injection: role of tachykinin receptors. **Journal of Pharmacology Sciences**, v.94, p.384-392, 2004.

SARIA, A.; LUNDBER, J. M.; SKOFITSCH, G.; LEMBECK, F. Vascular protein linkage in various tissue induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin, histamine and by antigen challenge. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.324, n.3, p.212-218, 1983.

SCHOLZ, D.; DEVAUX, B.; HIRCHE, A.; POTZSCH, B. KROPP, B.; SCHAPER, W.; SCHAPER, J. Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. **Cell and Tissue Research**, v.284, p.415-423, 1996.

SCHWARZBAUER, J. E. Cell migration: may the force be with you. **Current Biology: CB**, v.7, p.5, p.R292-R294, 1997.

SEDGWICK, D.; WILLOUGHBY, D.A . Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: **Handbook of inflammation**, v.5, p.27-47, 1985.

SHIBATA, M.; HORI, T.; KIYOHARA, T.; NKASHIMA, T.; ASAMI, T. Responses of anterior hypothalamic-preoptic thermosensitive neurons to substance P and capsaicin. **Neuropharmacology**, v.27, n.2, p.143-148, 1988.

SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; MIYAKE, K.; KIMOTO, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll-like receptor 4. **The Journal of Experimental Medicine**, v.189, n.11, p.1777-1782, 1999.

SIMONS, C. T.; KULCHITSKY, V. A.; SUGIMOTO, N.; HOMER, L. D.; SZÉKELY, M.; ROMANOVSKY, A. A. Signaling the brain in systemic inflammation: which vagal branch is involved in fever genesis? **American Physiological Society**, v.275, p.R63-R68, 1998.

SKIDGEL, R. A.; ERDOS, E. G. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. **Peptides**, v.25, p.521-525, 2004.

- SKOFF, A. M.; ZHAO, C.; ADLER, J. E. Interleukin-1alpha regulates substance P expression and release in adult sensory neurons. **Experimental Neurology**, v.217, n.2, p.395-400, 2009.
- SMITH, C. H.; BARKER, J. N.; MORRIS, R. W.; MacDONALD, D. M.; LEE, T. H. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. **Journal of Immunology**, v.151, n.6, p.3274-3282, 1993.
- SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S. H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents and Actions**, v.24, n.3/4, p.377-380, 1988.
- SOUZA, G. E.; CARDOSO, R. A.; MELO, M.C.; FABRÍCIO, A. S.; SILVA, V. M.; LORA, M.; BRUM-FERNANDES, A. J.; RAE, G. A.; FERREIRA, S. H.; ZAMPRONIO, A. R. Comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyrone in rats. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v.51, p.24-32, 2002.
- SPRINGER, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annual Review of Physiology**, v.57, p.827-872, 1995.
- STADNYK, A.; GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. **Immunology Today**, v.12, p.A7-A12, 1991.
- STEINER, A. A.; HUNTER, J. C.; PHIPPS, S. M.; NUCCI, T. B.; OLIVEIRA, D. L.; ROBERTS, J. L.; SCHECK, A. C.; SIMMONS, D. L.; ROMANOVSKY, A. A. Cyclooxygenase-1 or -2-which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia? **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.297, n.2, p.R485-R494, 2009.
- STRIJBOS, P. J.; HARDWICK, A. J.; RELTON, J. K.; CAREY, F.; ROTHWELL, N. J. Inhibition of central actions of cytokines on fever and thermogenesis by lipocortin-1 involves CRF. **American Journal of Physiology**, v.263, p.E632-636, 1992.
- SULPIZIO, A. C.; PULLEN, M. A.; EDWARDS, R. M.; BROOKS, D. P. The effect of acute angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase 24.11 inhibition on plasma extravasation in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.309, p.1141-1147, 2004.
- SUN, J.; RAMMATH, R. D.; BHATIA, M. Neuropeptide substance P upregulates chemokine and chemokine receptor expression in primary mouse neutrophils. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v.293, n.2, p.C696-C704, 2007.
- SZELÉNYI, Z.; SZÉKELY, M.; BALASKÓ, M. Role of Substance P (SP) in the mediation of endotoxin (LPS) fever in rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.813, p.316-323, 1997.

SZÉKELY, M.; BALASKÓ, M.; KULCHITSKY, V. A.; SIMONS, C. T.; IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A. A. Multiple neural mechanisms of fever. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v.85, p.78-82, 2000.

TAKEDA, Y.; BLOUNT, P.; SACHAIS, B. S.; HERSHEY, A. D.; RADDATZ, R.; KRAUSE, J. E. Ligand binding kinetics of substance P and neurokinin A receptors stably expressed in Chinese hamster ovary cells and evidence for differential stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate and cyclic AMP second messenger responses. **Journal of Neurochemistry**, v.59, p.740-745, 1992.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v.17, n.1, p.1-14, 2005.

TAPPER, H. Out of the phagocyte or into its phagosome: signalling to secretion. **European Journal of Haematology**, v.57, n.3, p.191-201, 1996.

TKACHENKO, E. Y.; KOZARUK, V. P.; KOZYREVA, T. V. Effect of substance P on thermoregulation parameters during different cooling modes. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.141, n.6, p.695-697, 2006.

TOBIAS, P. S.; SOLDAU, K.; IOVINE, N. M.; ELSBACH, P.; WEISS, J. Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n.30, p.18682-18685, 1997.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: an update review of its biology. **Critical Care Medicine**, v.21, p.S415-S422, 1993.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. **Annual Review of Medicine**, v.45, p.491-503, 1994.

TULUE, F.; LAI, J. P.; KILPATRICK, L. E.; EVANS, D. L.; DOUGLAS, S. D. Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity. **Trends in Immunology**, v.30, n.6, p.271-276, 2009.

TUREK, V. F.; OLSTER, D. H.; ETTENBERG, A.; CARLISLE, H. J. The behavioral thermoregulatory response of febrile female rats is not attenuated by vagotomy. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.80, p.115-121, 2005.

UENO, A.; TOKUMASU, T.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of bradykinin in endotoxin-induced vascular permeability increase in the skin of rats. **European Journal of Pharmacology**, v.284, n.1-2, p.211-214, 1995.

USHIKUB, F.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; MURATA, T.; MATSUOKA, T.; KOBAYASHI, T.; HIZAKI, H.; TUBOI, K.; KATSUYAMA, M.; ICHIKAWA, A.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; NARUMIYA, S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E2 receptor subtype EP3. **Nature**, v.395, n.6699, p.281-284, 1998.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature: New Biology**, v.231, p.232-235, 1971.

VERON, M.; GUENON, I.; NENAN, S.; EMONDS-ALT, X.; ADVENIER, C.; LAGENTE, V.; BOICHOT, E. Interactions of thachykinin receptor antagonists with lipopolysaccharide-induced airway inflammation in mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.31, p.634-640, 2004.

VILCEK, J.; LE, J. M. Immunology of cytokines: an introduction. **Cytokine Handbook**, 2a ed., Thompson, A.W., 1-19. Academic Press, Londres, 1994.

VOGEL, S. N.; HOGAN, M. M. The role of cytokines in endotoxin-mediated host responses. In: **Immunopharmacology-The Role of Cells and Cytokines in Immunity and Inflammation** (OPPENHEIM, J. J.; SHEVACK, E. M., eds), p.238-258, Oxford University Press, New York.

VON-ADRIAN, U. H.; CHAMBERS, J. D.; McEVOY, L. M.; BARGATZE, R. F.; ARFORS, K. E.; BUTCHER, E. C. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte  $\alpha$ 2-integrins in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.7538-7542, 1991.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, v.52, p.349-374, 2000.

WAN, Y.; FREESWICK, P. D.; KHEMLANI, L. S.; KISPERT, P. H.; WANG, S. C.; SU, G. L.; BILLIAR, T. R. Role of lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats. **Infection and Immunity**, p.2435-3442, 1995.

WANG, H.; LIAO, H.; OCHANI, M.; JUSTINIANI, M.; LIN, X.; YANG, L.; AL-ABED, Y.; WANG, H.; METZ, C.; MILLER, E. J.; TRACEY, K. J.; ULLOA, L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. **Nature Medicine**, v.10, n.11, p.1216-1221, 2004.

WATANABE, K.; IIDA, M.; TAKAISHI, K.; SUZUKI, T.; HAMADA, Y.; IIZUKA, Y.; TSURUFUJI, S. Chemoattractants for neutrophils in lipopolysaccharide-induced inflammatory exsudate from rats are not interleukin-8 counterparts but gro-gene-product / melanoma-growth-stimulating-activity-related factors. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v.214, p.267-270, 1993.

WEAVER, D. L. Normal inflammatory response to injury. **Inflammation I**. Singapore Ed. Thornborough, p.13-68, 1995.

WEINSTOCK, J. V.; BLUM, A.; WALDER, J.; WALDER, R. Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansoni produce substance P. **Journal of Immunology**, v.141, n.3, p.961-966, 1988.

WERNER, M. F.; FRAGA, D.; MELO, M. C.; SOUZA, G. E.; ZAMPRONIO, A. R. Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by

intraperitoneal LPS injection. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society...** [et al.], v.52, p.291-296, 2003.

WERNER, M. F.; SOUZA, G. E.; ZAMPRONIO, A. R. Nimesulide-induced antipyresis in rats involves both cyclooxygenase-dependent and independent mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v.543, n.1-3, p.181-189, 2006.

WILLIAMS, M. A.; SOLOMKIN, J. S. Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. **Journal of Leukocyte Biology**, v.65, p.725-736, 1999.

WU, X.; YOSHIDA, A.; SASANO, T.; IWAKURA, Y.; ENDO, Y. Histamine production via mast cell-independent induction of histidine decarboxylase in response to lipopolysaccharide and interleukin-1. **International Immunopharmacology**, v.4, n.4, p.513-520, 2004.

YARAE, R.; EBTEKAR, M.; AHMADIANI, A.; SABAHI, F. Neuropeptides (SP and CGRP) augment pro-inflammatory cytokine production in HSV-infected macrophages. **International Immunopharmacology**, v.3, p.1883-1887, 2003.

ZAMPRONIO, A. R.; SOUZA, G. E.; SILVA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. **The American Journal of Physiology**, v.266, p.R1670-R1674, 1994.

ZAMPRONIO, A. R.; MELO, M. C.; HOPKINS, S. J.; SOUZA, G. E. Involvement of CRH in fever induced by a distinct pre-formed pyrogenic factor. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society...** [et al.], v.49, p.473-479, 2000.

ZEISBERGER, E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. **Journal of Thermal Biology**, v.24, p.287-326, 1999.

ZHANG, H.; SUN, G. LPS induces permeability injury in lung microvascular endothelium via AT<sub>1</sub> receptor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.441, n.1, p.75-83, 2005.

ZHANG, Y. H.; LU, J.; ELMQUIST, J. K.; SAPER, C. B. Specific roles of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced fever and Fos expression in rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v.463, n.1, p.3-12, 2003.

ZIGMOND, S. H. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. **The Journal of Cell Biology**, v.75, p.606-616, 1977.

ZIGMOND, S. H. Chemotaxis by polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Cell Biology**, v.77, n.2, p.269-287, 1978.

ZIMMERMAN, G. A.; McINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M. Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions. **The Journal of Clinical Investigation**, v.98, p.1699-1702, 1996a.

ZIMMERMAN, G. A.; ELSTAD, M. R.; LORANT, D. E.; McINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M.; TOPHAM, M. K.; WEYRICH, A. S.; WHATLEY, R. E. Platelet-activating factor (PAF) signaling and adhesion in cell-cell interactions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.416, p.269-304, 1996b.